Beiträge zur Kenntnis der Enzyme des Roggenmalzes.

Johann Hilpoltsteiner.

Beiträge zur Kenntnis der Enzyme des Roggenmalzes.

Von der

Kgl. Technischen Hochschule zu München

zur

Erlangung der Würde eines Doktors der Technischen Wissenschaften

(Doktor-Ingenieurs)

genehmigte Dissertation.

ACAD.
LUGD.BAT.
BIBL.

Vorgelegt von

Johann Hilpoltsteiner

Diplom-Ingenieur und Diplom-Landwirt

aus Berching.

Referent:
Prof. Dr. C. J. Lintner.

Korreferent:
Prof. Dr. A. Lipp.

Tag der mündlichen Prüfung:
1. Dezember 1911.

Regensburg 1912.

Druck der Verlagsanstalt vorm. G. J. Manz.

Vorliegende Arbeit wurde im gärungschemischen Laboratorium der Kgl. Technischen Hochschule zu München ausgeführt.

Es sei mir gestattet, meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. C. J. Lintner, auf dessen Anregung diese Arbeit entstand, für das wohlwollende Interesse, welches er derselben stets entgegenbrachte, auch an dieser Stelle meinen ergebensten Dank auszusprechen.

Meiner Mutter

und

dem Andenken meines Vaters

in

Liebe und Dankbarkeit gewidmet.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546317_0058

Einleitung.

In der Zeitschrift für Spiritusindustrie (1907 S. 541) erinnerte Karl Windisch wieder an das schon lange bekannte, zuerst einem französischen Chemiker patentierte Verfahren, wonach in verschiedenen kleineren Brennereien, Spiritus aus Getreide (vor allem handelt es sich um Roggen), ohne Zuhilfenahme von Malz, gewonnen wird. Nach Angaben der Praxis stellte Windisch selbst Versuche im kleinen an und kam zu dem überraschenden Ergebnis, dass die Alkoholausbeute fast dieselbe ist, ganz gleich, ob Schrot von gekeimten oder ungekeimten Roggen zur Anwendung gelangte.

Die Arbeitsweise Windisch' war kurz folgende:

In 540 ccm Wasser von 65° C wurden 300 g Grobschrot eingemaischt. Nach einhalbstündigem Stehen im bedeckten Gefäss wurden 600 ccm siedendheisses Wasser hinzugefügt und dadurch die Temperatur auf 65—66° C erhöht. Nachdem nun die Maische zwei Stunden lang bei dieser Temperatur gestanden hatte, versetzte man sie unter Umrühren mit kaltem Wasser, bis das Thermometer 31° C anzeigte. Hierauf wurden 3,75 g Presshefe dazugegeben und die ganze Maische in die Gärflasche übergespült. Nach 5tägiger Gärung erzielte man eine Alkoholausbeute von 76,5 g oder, auf 100 kg Rohstoff berechnet, eine solche von 32,1 l.

Annähernd die gleiche Menge wurde bei Benützung von Roggenmalz erhalten.

Dieses Ergebnis ist auf den ersten Blick sehr auffallend; doch man muss bedenken, dass der Roggen ein sogen. „hitziges" Getreide ist, welches leicht tiefgreifenden Veränderungen enzymatischer Natur während seiner Aufbewahrung unterworfen sein kann, bedingt durch die spezifische Neigung seiner Eiweisskörper, Fermente der verschiedensten Art unter den gerade gegebenen Bedingungen zu bilden. (Vergl. Delbrück: Der physiologische Zustand der Zelle. [Jahrb. d. Vereins d. Spiritusfabrikanten 1907.])

Ausser der erhöhten Verzuckerungsenergie des Roggens im

Vergleich zu jener anderer Getreidearten, darf hier nicht der Einfluss der Hefe auf die Diastase übersehen werden, der, wie Morris (Wochsch. f. Brauerei 1902 S. 83) nachwies, unter Umständen als ein äusserst günstiger bezeichnet werden muss und der gerade bei den Versuchen Windisch' in erheblichem Masse zur Geltung kommen kann. Dieser Forscher stellte fest, dass die Diastase bei Gegenwart von Hefe eine wesentlich stärkere, annähernd dreimal so kräftige Wirkung ausübt, als für sich allein. So soll das sogen. beständige Dextrin, weder von Hefe allein, noch von Diastase allein unter den gewöhnlichen Verhältnissen angegriffen werden, kann aber von der Hefe bei Gegenwart von wirksamer Diastase vergoren werden.

Windisch hat seine Versuche auch auf andere Rohstoffe der Brennerei ausgedehnt, ist hier aber nicht zu dem gleichen günstigen Resultate gelangt. Die Ausbeuten waren zum Teil viel schlechter, was er auf den Mangel an genügender Menge von Diastase in diesen Rohstoffen zurückführt. Doch kann dieser Behauptung O. Heinzelmann (Zeitschr. f. Spiritusindustrie 1908 S. 12) nicht zustimmen, der vielmehr glaubt, dass die Stärke dieser Rohstoffe erst bei höherer Temperatur, als der angewendeten verkleistert wird, weshalb die vorhandene an sich ja geringe Menge von Diastase nicht zur vollen Wirksamkeit gelangen kann.

Die Anwesenheit von Diastase in den ruhenden Samenkörnern ist schon lange bekannt. Doch geraume Zeit war man, trotz der fast unübersehbaren Fülle von Arbeiten, nicht im Klaren, ob die Rohkorndiastase mit jener des gekeimten Samens identisch ist, ob ferner das Verzuckerungs- und Verflüssigungsvermögen ein und demselben Enzym eigen ist, oder ob diese Eigenschaften verschiedenen Enzymen zukommen. Es bedurfte vieler und langwieriger Versuche, um in diese Verhältnisse einiges Licht zu bringen und wenn man die gesamte diesbezügliche Literatur überschaut, so muss man leider gestehen, dass in manchen Punkten noch nicht das gewünschte Ergebnis erzielt wurde, ja dass sogar zur Erklärung ein und derselben Erscheinung die widersprechendsten Meinungen herangezogen werden. Der Grund dieser Differenzen liegt vor allem in der verschiedenen, zum Teil noch nicht völlig einwandfreien Arbeitsmethode der einzelnen Forscher, dann aber auch in der Schwierigkeit des ganzen Arbeitgebietes überhaupt.

Um nur die wichtigsten Daten aus der geschichtlichen Entwicklung dieser Erklärungstheorien herauszugreifen, sei erwähnt, dass zuerst die englischen Forscher Brown und Morris (Zeitschr. f. d. ges. Brw. 1890) sich mit der Sache eingehend befassten. Nach ihnen unterscheidet sich die im ruhenden Korn enthaltene Diastase

von jener des gekeimten dadurch, dass erstere Stärkekleister nicht zu verflüssigen vermag, während letztere eine beträchtliche verzuckernde und verflüssigende Kraft besitzt.

In ähnlichem Sinne äussern sich Lintner und Eckhardt (Zeitschr. f. d. ges. Brauw. 1889); doch konnten sie auch ein schwaches Verflüssigungsvermögen konzentrierter Gerstenauszüge nachweisen.

Demgegenüber behauptet Evans (Wochschr. f. Br. 1900), dass es ihm selbst nach 14tägiger Einwirkung nicht gelungen ist, eine Umwandlung des Stärkekleisters zu konstatieren.

Bald darauf konnte jedoch Baker (Transaction of Chem. Society 1902) die Ergebnisse der Lintnerschen Versuche im vollen Umfang bestätigen.

Von neueren wichtigen Arbeiten über diesen Gegenstand seien angeführt die Versuche Jalowetz' (Wochsch. f. Br. 1908 S. 557), die beweisen, dass man nicht berechtigt ist, in der ruhenden Gerste ein anderes diastatisches Enzym anzunehmen, als im Malz. Denn das verflüssigende Ferment ist im ruhenden Korn hauptsächlich in den Keimlingsenden aufgestapelt, weshalb die Extrakte aus Gerste nur sehr wenig von dem Enzym enthalten können. Die Verflüssigung gelingt dagegen leicht mit Auszügen aus den Keimlingsenden.

Ähnlicher Ansicht ist auch Chrzaszcz (Zeitschr. f. Sp.-Ind. 1909 und 1910) und er bringt dadurch die Theorie der oben erwähnten englischen Forscher, nämlich die Annahme einer Translokations- und Sekretionsdiastase fast völlig zum Verschwinden. Chrzaszcz geht sogar noch weiter, indem er behauptet, dass die verzuckernde und verflüssigende Wirkung ein und demselben Enzym — der Diastase — eigen sei. Diese Ansicht stützt sich freilich nur auf die Tatsache, dass neben der verzuckernden Kraft stets eine verflüssigende beobachtet wird; — ein Beweisgrund, der, wie später gezeigt werden soll, auf sehr schwachen Füssen stehen dürfte.

Dagegen glauben wieder andere Forscher, so Fränkel und Hamburg (Zeitschr. f. d. ges. Biochemie 1906 Bd. 3 S. 389) die Existenz zweier Enzyme nachgewiesen zu haben. Nach ihren Angaben ist es ihnen gelungen, beide Enzymgruppen durch Dialyse gegen gekochtes Brunnenwasser fast quantitativ zu trennen, wobei das verzuckernde infolge seiner geringen Molekulargrösse durch die Membran in das Wasser wandert, während das verflüssigende grösstenteils in Ruhe bleibt. Eine vollständige Trennung ist ihnen aber missglückt, wodurch auch die Beweiskraft dieses Ergebnisses bedeutend abgeschwächt wird. Denn solange es nicht möglich ist,

durch eine einwandfreie, sichere Methode eine vollkommene Isolierung herbeizuführen, wird man nicht in der Lage sein, ein definitives Urteil in diesem oder jenem Sinne zu fällen.

In der Annahme nun, dass vielleicht der Roggen, wegen der oben erwähnten, abnormen Eigenschaften seiner Diastase, ein geeignetes Material sei, um diesen schwierigen Fragen näherzutreten, wurde diese Arbeit in Angriff genommen.

Experimenteller Teil.

I. Versuche zur Bestimmung der Wirksamkeit der Diastase des ungekeimten Roggens.

Zunächst galt es den interessanten Versuch Windisch' zu wiederholen, in der Absicht, die durch den Maischprozess gebildete Zuckermenge quantitativ zu bestimmen, um so einen sicheren Schluss auf die verzuckernde Wirkung der Roggendiastase ziehen zu können. Dabei wurde genau nach Angabe Windisch' vorgegangen.

Doch sehr bald machte man die unliebsame Beobachtung, dass das Maischprodukt unter keinen Umständen zu filtrieren war; weil es eben fast durchwegs aus Kleister bestand, — ein sicheres Zeichen für die mangelhafte Verzuckerung.

Windisch schreibt allerdings (a. a. O.): „Bei diesem Verfahren darf das Rohmaterial nicht gekocht oder gedämpft werden; die Stärke also nicht verkleistert werden" und ferner: „In zweifacher Hinsicht unterscheiden sich unsere Versuche von dem üblichen Verfahren der Branntweinbereitung; während nämlich im normalen Betrieb die Stärke der Rohstoffe verkleistert, teilweise sogar löslich gemacht und durch künstlich zugesetzte Diastase verzuckert wird, tritt in unsern Versuchen die in den Rohstoffen enthaltene Diastase in Wirksamkeit und zwar hat sie die Aufgabe, die Rohstärke zu verzuckern." Windisch übersieht hier, dass die Versuchstemperatur von 65—66° C bereits hinreicht, die Stärke zur Quellung und zur Verkleisterung zu bringen.

Merkwürdig ist nun, dass trotz der ungenügenden Verzuckerung, durch die nachfolgende Vergärung des Maischgutes mit Presshefe, die mit den Resultaten Windisch' annähernd übereinstimmende Menge Alkohol erzielt wurde.

Alkoholgehalt der vergorenen Maische:

nach meinen Versuchen 3,95 Gew. %
nach Windisch 4,14 „ %.

Der Gärrückstand gab freilich noch eine deutliche Jodreaktion, — eine Erscheinung, die auf das Vorhandensein unveränderten Stärkekleisters schliessen lässt. Bei der mikroskopischen Untersuchung

des Gärrückstandes wurde das Hauptaugenmerk auf die Hefe gerichtet und dabei eine völlige Veränderung der Zellform und des Zellinhaltes derselben wahrgenommen. Jede Hefezelle war deutlich eingeschrumpft und eine beträchtliche Menge derselben war sogar bereits abgetötet. Daraus erklärt sich die unvollkommene Vergärung; die Hefe versagte ihren Dienst. Und was war die Ursache?

Darüber geben uns neuere Veröffentlichungen des Institutes für Gärungsgewerbe in Berlin Aufschluss. Hiernach ist es H. Lange (Über den physiologischen Zustand der Hefe 1907) gelungen, eine höchst sonderbare Beobachtung zu machen. Er wies nämlich nach, dass Getreideschrot, besonders Roggenschrot, das bisher als ganz ungefährlich und harmlos galt, unter gewissen Bedingungen eine eigenartige Giftwirkung auf die Hefe auszuüben imstande ist, sodass in ganz kurzer Zeit fast sämtliche Hefezellen zum Absterben gebracht werden. Über die Art des Giftes, ob Alkaloid, ob Antienzym usw. ist man sich noch nicht einig.

Demgegenüber hat dieser Forscher aber wieder festgestellt, dass Roggenmehl auch eine anregende Wirkung auf die Gärkraft der Hefe zu äussern vermag, dass es die Rolle eines Reizstoffes übernehmen kann. Ausschlaggebend ist nur die Menge des Roggenschrotes. Geringe Quantitäten wirken günstig; grössere schädlich.

Daraus erhellt unmittelbar, dass die Schädigung der Hefe und die unvollständige Vergärung im obigen Versuche, zum Teil wenigstens, auf die Giftwirkung des Roggens zurückgeführt werden muss; denn es waren alle Bedingungen dazu erfüllt. Wenn diese Erscheinung in der Praxis des Brennereibetriebes nicht wahrgenommen wird, so liegt der Grund darin, dass hierbei grösstenteils Roggenmalz angewendet wird und die giftigen Eigenschaften durch das Mälzen zerstört werden.

Der intensiv saure Charakter des Gärrückstandes deutet aber ausserdem noch auf das Überhandnehmen gewisser Bakterien, die gewiss auch ihrerseits dazu beigetragen haben, die Tätigkeit der Hefe zu hemmen.

Warum es aber trotzdem gelingt, auf diese Weise, wenn auch nicht die gleichen, so doch annähernd dieselben Resultate, wie mit Zuhilfenahme von Roggenmalz zu erhalten, vermag man nicht anzugeben.

Diese Versuche bilden gleichsam den Ausgangspunkt zu dem nun folgenden Hauptteil der Abhandlung, indem sie unwillkürlich auf die Enzyme des Roggens unsere Blicke lenken, zu eingehenderem Studium herausfordern und ferner in manchen Punkten zum Vergleich mit jenen der Gerste einladen.

Der zur Anwendung gekommene Roggen hatte ein Verzukkerungsvermögen von

F = 185 g Maltose (bestimmt nach Lintner-Wirth).

Gleichfalls konnte ein Verflüssigungsvermögen nachgewiesen werden; wenn dasselbe auch nur gering war. Vielleicht liegt der Grund in der weniger empfindlichen Arbeitsmethode, gegenüber jener der Verzuckerung.

Die entsprechenden Versuche lieferten bei einer Gerste, ein Verzuckerungsvermögen von

F = 146,8 g Maltose;

während die verflüssigende Wirkung noch schwächer war, als jene des Roggens.

Das Verflüssigungsvermögen wurde im wesentlichen nach der Methode von Lintner-Solied bestimmt. Nur in jenen Fällen, in denen von vornherein eine schwache Verflüssigung zu erwarten war, wurde nach Angabe Chrzaszcz' (Zeitschr. f. Sp.-Industr. 1910 S. 98) ein 6% Stärkekleister benützt, da dadurch die Empfindlichkeit der Methode erheblich gesteigert wird.

Ausserdem habe ich bei den zahlreichen von mir ausgeführten Bestimmungen die Erfahrung gemacht, dass es zweckmässig ist, die Verdünnung des zu prüfenden Auszuges so zu wählen, dass der gesuchte Punkt in ein höheres Röhrchen fällt; also etwa bei Zusatz von 0,4—0,8 ccm Auszug die Verflüssigung erfolgt. Zur Bestimmung des richtigen, brauchbaren Verdünnungsgrades, sind allerdings Vorversuche notwendig; die darauf verwendete Zeit und Mühe werden aber durch die Vorteile, die diese Methode mit sich bringt, vollkommen aufgewogen.

Nicht unerwähnt darf bleiben, dass die verflüssigende Wirkung wie später gezeigt werden soll, von verschiedenen äusseren Faktoren (Salze) beeinflusst wird. Man hat daher bei der Ausführung der Versuche mit peinlicher Genauigkeit darauf zu achten, dass reine Reagentien und dass ganz besonders auch möglichst widerstandsfähige Gläser zur Benutzung kommen. An erster Stelle dürften wohl Röhrchen aus Jenaerglas stehen.

Das zu den Versuchen erforderliche Roggenmalz wurde auf folgende Weise erhalten:

Der Roggen wurde nach sorgfältigem Waschen und tunlichster Beseitigung jeder Art von Unkraut, sowie der verletzten Körner, in einem Blechkasten mit doppeltem Boden eingeweicht. Nach Verlauf eines Tages, während dessen das Weichwasser mehrmals gewechselt wurde, konnte die Weiche als beendet gelten und der Roggen zur Keimung angesetzt werden. Um einem Austrocknen des keimenden Kornes vorzubeugen, und einen dadurch bedingten

Stillstand der Keimung hintanzuhalten, musste während der ganzen Keimperiode täglich früh und abends mit Wasser entsprechend befeuchtet werden, was sich am besten mit einer Streudüse bewerkstelligen liess, die mit einer Luftpumpe in Verbindung stand. Nach Ablauf der gewählten Keimdauer wurde jeweils ein entsprechender Teil des Keimgutes weggenommen, daraus die ungekeimten Körner nach Möglichkeit beseitigt, und nun liess man das so erhaltene Grünmalz in dünner Schicht ausgebreitet, an der Luft liegen, gut abtrocknen, — abschwelken.

II. Beeinflussung der Wirksamkeit der Diastase durch verschiedene Extraktions-Temperaturen.

Von Interesse war es nun, den Einfluss der Extraktionstemperatur auf die Löslichkeit der diastatischen Roggen- und Gerstenenzyme zu studieren, in der Absicht, dadurch etwaige Differenzen in dem gegenseitigen Verhalten aufzufinden, aus denen dann gewisse Rückschlüsse gezogen werden können.

Versuch I.

Extraktionszeit: $^1/_2$ Stunde.

Temp.	Roggenmalz		Gerstenmalz	
	Verflüssigungsvermögen V=	Verzuckerungsvermögen F=	Verflüssigungsvermögen V=	Verzuckerungsvermögen F=
20°	87,3	97,9	44,0	338,2
30°	132,2	133,8	73,4	339,0
40°	282,5	154,5	121,2	357,5
50°	375,2	189,6	145,2	434,8
60°	361,1	181,3	105,5	282,5
70°	136,1	58,3	35,1	28,4
80°	0	0	0	0

Die kurze Digestionszeit von einer halben Stunde und die trotzdem verhältnismässig kräftige Wirkung deutet darauf hin, dass wir es mit sehr leicht löslichen Stoffen zu tun haben. Ferner lässt eine vergleichende Betrachtung der in der Tabelle zusammengestellten Versuchsergebnisse erkennen, dass das Verzuckerungsvermögen des Gerstenmalzes, jenes des Roggens übertrifft; während die verflüssigende Kraft des ersteren geringer, als jenes des letzteren ist.

Für die Enzymprozesse ist im Gegensatz zu andern ähnlichen Vorgängen, z. B. der Hydrolyse von Kohlenhydraten unter Einwirkung verdünnter Säuren, das Verhalten zur Temperatur charakteristisch. Während die letztere Wirkung um so kräftiger vor sich geht, je höher die Temperatur ist, wird die fermentative Tätigkeit beeinträchtigt, ja ganz zum Verschwinden gebracht, wenn einmal ein gewisses Temperaturmaximum erreicht ist.

In ähnlicher Weise nimmt die Löslichkeit des Enzyms bei höherer Extraktionstemperatur zu, jedoch nur bis zu 50°. Wird diese überschritten, so geht wohl nicht die Löslichkeit zurück, aber das in Freiheit gesetzte Enzym erleidet durch die stärkere Erwärmung eine beträchtliche Abschwächung seiner Fähigkeit die Stärke zu verflüssigen und zu verzuckern, sodass eine einhalbstündige Extraktion bei 80° genügt, um jede fermentative Wirkung gänzlich aufzuheben. Als Ursache dieser Erscheinung gilt die durch höhere Temperatur bedingte Veränderung der Eiweisssubstanz, jenes Körpers, von dem man annimmt, dass er den Grundstoff jeden Fermentes darstellt. Mit dieser Umgestaltung suchte man auch die Unwirksamkeit, den Tod, eines jeden Enzyms zu verbinden; an eine Regeneration der enzymatischen Kraftäusserung dachte wohl niemand und hielt es auch nicht für wahrscheinlich. Man wusste zwar, dass einige Oxydasen selbst kurzes Kochen vertragen können und führte es eben auf die grössere Widerstandsfähigkeit dieser Fermente gegenüber höherer Temperatur zurück.

Versuch 2.

Erst in neuester Zeit hat ein russischer Forscher (vgl. Hoppe-Seyler: Zeitschr. f. Physiologie 1910 S. 286) Versuche darüber angestellt und ist zu merkwürdigen, die herrschenden Anschauungen über das Wesen und Wirken der Enzyme umstossenden Ergebnissen gekommen. Er fand, dass die Diastaselösungen, die bis zu 100° erhitzt wurden und dadurch ihre spezifischen Eigenschaften verloren hatten, nach dem Abkühlen und längerem Stehen an der Luft, allmählich wieder ihre ursprüngliche fermentative Kraft erlangten, ja sogar in manchen Fällen noch wirksamer wurden als zuvor.

Diese merkwürdigen Angaben schienen im ersten Moment nicht recht glaubwürdig, weshalb eine Nachprüfung angezeigt war.

Es wurde deshalb versucht, mit Hilfe der Lintner-Wirth-Methode zur Bestimmung der verzuckernden Kraft, die doch die genaueste in dieser Richtung sein dürfte, die Ergebnisse zu kontrollieren. Aber bald überzeugte man sich von deren Unzulänglichkeit in diesem Falle, da die Enzymlösungen zu verdünnt und infolge-

dessen die Schwankungen im Verzuckerungsvermögen zu gering waren, um überhaupt nachgewiesen zu werden.

Aus diesem Misserfolg erhellt bereits, dass die etwaigen Veränderungen in der verzuckernden Kraft sehr gering sind und für die Praxis ohne jede Bedeutung sein dürften.

Nun musste dazu übergegangen werden, einzelne vom Verfasser genauer beschriebenen Versuche nachzuprüfen. Zu diesem Zweck wurde 0,1 prozentige Takadiastaselösung auf 90° erhitzt, rasch abgekühlt und klar filtriert. 10 ccm hievon wurden sofort mit 10 ccm Stärkekleister (1 : 100) versetzt, eine halbe Stunde stehen gelassen und dann der gebildete Zucker titrimetrisch unter Anwendung von Eisenrhodanür als Indikator bestimmt. Die benutzte Fehling'sche Lösung wurde nach Vorschrift auf 1 : 4 verdünnt.

Es ergab sich: nach $^1/_2$ stündigem Stehen ein Verbrauch von
0,05 ccm Fehling'scher Lösung;
nach 3tägigem Stehen einer zweiten Probe wurden
0,2 ccm Fehling'sche Lösung benötigt.

Bei der Ausführung dieser Versuche machte sich sehr bald ein Missstand recht unangenehm bemerkbar. Denn infolge der relativ grossen Menge angewandter Diastaselösung (10 ccm) ist der Eiweissgehalt ziemlich beträchtlich, wodurch scheinbar die Fällung des Kupferoxyduls erschwert wird. Statt des pulverförmigen, sich rasch absetzenden Cu_2O wurde beständig das kolloidale Kupferoxydulhydrat $Cu_2(OH)_2$ ausgeschieden, das die Titration (Tüpfelprobe) sehr behinderte.

Um diesen Übelstand abzuhelfen, wurde versucht, gleich nach der Verzuckerung das Eiweiss mit Phosphorwolframsäure auszufällen. Dadurch wurde zwar die Arbeitsweise etwas erleichtert, aber die Ausfällung war noch nicht der gewöhnlichen entsprechend, weshalb die unliebsame Erscheinung doch irgend einem andern Umstand zugeschrieben werden muss.

Die Versuche wurden auch auf andere Diastasen ausgedehnt. (Diastase absol. Merck; Roggenmalz- und Gerstenmalzdiastase.) Eine geringe Zunahme war wohl überall zu beobachten, wodurch die Resultate des Verfassers im grossen und ganzen bestätigt sein dürften. Doch nie ist es gelungen, selbst nach vierwöchentlichem Stehen an der Luft unter Toluolzusatz, eine vollständige Regeneration festzustellen. Würde diese stattfinden, dann müsste es möglich sein, dieselbe mit Hilfe der einwandfreien Lintner-Wirth-Methode nachzuweisen, was jedoch niemals der Fall war.

In Anbetracht der etwas ungenauen Arbeitsmethode und der geringen Zunahme des Verzuckerungsvermögens bin ich nicht in der Lage, ein sicheres Urteil abzugeben. Ein kleines Anwachsen

der diastatischen Kraft konnte ja überall konstatiert werden, aber nie in dem Masse, wie der betreffende Autor es angibt. Vielleicht stand ihm ein wirksameres Diastasepräparat zur Verfügung.

Was nun die Erklärung dieses Vorganges anlangt, so ist sie wohl noch vollkommen ins Dunkel gehüllt und es wird noch geraume Zeit dauern, bis auch hierin das nötige Licht gebracht ist. Der Wirklichkeit am nächsten wird sicher jene kommen, die annimmt, dass ein Teil des Fermentes und seien es auch nur Spuren, die Erhitzung überdauert und nach dem Abkühlen wieder seine Tätigkeit entfaltet. Wohl bestreitet der Autor diese Annahme, aber solang man an der bisherigen Enzymtheorie festhält, dürfte sie die einzig richtige sein.

Anmerkung: Interesssant ist es, dass Euler (Allgem. Chemie der Enzyme S. 167 und 175) auf Grund rein theoretischer Erwägungen gleichfalls geneigt ist, für die Invertase wenigstens, eine Regeneration fermentativer Eigenschaften anzunehmen.

Versuch 3.

Mit der Zunahme der Löslichkeit des Enzyms bei höherer Extraktionstemperatur geht Hand in Hand eine Vermehrung der Säure, — ein Umstand, der die Vermutung auftauchen lässt, dass die gesteigerte Energie, der bei höherer Temperatur hergestellten Auszüge allein auf die Wirkung der grösseren Säuremenge zurückzuführen und das Enzym ganz und gar unbeteiligt sei. Denn es ist allgemein bekannt, dass bereits geringe Mengen schwacher Säuren, wie 0,9% Milchsäure eine Verflüssigung des Stärkekleisters hervorrufen können.

Zur Prüfung dieser Verhältnisse wurden Auszüge bei verschiedenen Temperaturen und Zeiten hergestellt, die Säuremenge durch Titration mit $^1/_{10}$ n Kalilauge bestimmt und die verflüssigende Kraft festgestellt.

Temp.	Verflüssigungsvermögen V in		Säuregehalt in 10 ccm Auszug; gemessen in $^1/_{10}$n KOH	
	1 h	5 h	1 h	5 h
20°	201,9	217,5	2,5	3,5
30°	217,5	235,1	2,5	4,0
40°	235,1	257,2	3,0	4,5
50°	282,2	296,2	2,5	4,0
60°	217,5	175,6	2,5	3,5
70°	59,9	0	2,0	3,0

Beim Vergleich der Optimumstemperatur der Säurezunahme mit jener, bei der die grösste Enzymmenge zur Lösung und zur Wirkung kommt, sieht man, dass erstere bei 40° — einer für die Milchsäurebakterien äusserst günstigen Temperatur — liegt, während letztere bei 50° angenommen werden muss. Schon daraus folgt, dass die gesteigerte Wirkung nicht allein der Säurevermehrung zugeschrieben werden darf.

Um aber hierüber völlige Klarheit zu erlangen, wurde ein bei der Optimumstemperatur hergestellter Auszug kurze Zeit im Kochen erhalten, die Enzyme also abgetötet und nun zur Bestimmung verwendet. Würde die Verflüssigung ganz oder teilweise von der Säure herrühren, so müsste sie hier zum Ausdruck kommen. Dieses war aber nicht der Fall; es konnte keine Spur einer Verflüssigung nachgewiesen werden.

Nun tritt aber noch die Frage an uns heran, ob nicht doch vielleicht die Säure einen Einfluss auf das Verflüssigungsvermögen geltend machen könnte, insofern nämlich, als sie das Enzym in der freien Entfaltung der genannten Eigenschaft hemmen oder begünstigen könnte. Zu diesem Zweck wurde der Auszug möglichst genau neutralisiert, unter Benützung von Phenolphtalein und Rosolsäure als Indikatoren, und dann die Prüfung vorgenommen. Niemals konnte jedoch eine Änderung in der verflüsssigenden Kraft weder im positiven noch negativen Sinne konstatiert werden.

Diese Erscheinung ist eigentümlich und sogar unwahrscheinlich; denn es wird allgemein angenommen und ist bereits weiter oben erwähnt, dass schwache Säuren selbst in geringer Menge eine Verflüssigung bewirken. Es wäre deshalb nicht zu verstehen, warum eine geringere Menge derselben Säure nicht auch bereits einen, allerdings schwächeren Einfluss äussern sollte, unter der Voraussetzung, dass die Methode hinreichend genaue Resultate liefert und ausserdem die angewandte Stärke völlig rein ist. Ferner kommt noch in Betracht und entspricht gleichfalls der herrschenden Anschauung, dass eine geringe Acididät das Zuckerbildungsvermögen der Diastase fördere. Weshalb sollte dann die Säure die Verflüssigung nicht beeinflussen, besonders wenn man annimmt, dass die verzuckernde und verflüssigende Kraft einem Enzym innewohnt? Nur in der geringeren Empfindlichkeit der Arbeitsmethode kann hier die Schuld liegen.

Soviel darf sicher angenommen werden, die Zunahme der Verflüssigung ist nicht in der stärkeren Säurekonzentration begründet, sondern diese ist einzig und allein bedingt durch die grössere Löslichkeit des Enzyms infolge längerer Extraktionszeit einerseits und günstigerer Temperatur anderseits.

Diese kurze Erörterung leitet über zu einer neuen Versuchsreihe, die einen Aufschluss über die Beeinflussung des Verflüssigungsvermögens durch verschiedene Faktoren geben soll.

III. Versuche über die Beeinflussung der verflüssigenden Wirkung der Diastase durch Elektrolyte.

Von einer Reihe von Enzymen ist bekannt, dass ihre Einwirkung auf ein Substrat von der Anwesenheit eines dritten Stoffes in starkem Masse beeinflusst wird. So gibt es Fermente, die ihre Tätigkeit überhaupt nur dann entfalten können, wenn ein bestimmter Körper in der Flüssigkeit anwesend ist: z. B. erfordert Pepsin die Gegenwart von Salzsäure, das Blutgerinnungsferment, Thrombin, und das Lab ein Kalksalz, und das tierische Trypsin wirkt am kräftigsten im schwachalkalischen Medium.

Von der grössten Wichtigkeit dürfte es daher sein, bei allen Untersuchungen über die Fermente gleichzeitig zu bestimmen, wie und in welchem Grade die Anwesenheit fremder Substanzen verändernd auf die Wirksamkeit derselben eingreift. Die grosse Mannigfaltigkeit der Enzyme und ihrer Wirkungen hat denn auch die Aufmerksamkeit der Forscher in erhöhtem Masse auf diese Frage gelenkt. Das bezeugt die umfangreiche Literatur, die uns von den zahlreichen Untersuchungen ein klares Bild gibt. Dass hierbei die Gerstenmalzdiastase hinsichtlich ihrer verzuckernden Kraft, im Vordergrund des Interesses steht, kann bei der überaus praktischen Bedeutung und der leichten Gewinnung derselben, ferner in Anbetracht der verhältnismässig sicheren und rasch auszuführenden Arbeitsweise nicht auffallend sein. Von den zahlreichen Literaturangaben mögen nur wenige Erwähnung finden:

Durch Zusatz von Asparagin, Eiweisskörper und Phosphaten hat Effront (Compt. rend. 126) eine Verstärkung der Zuckerbildung durch Diastase erhalten.

Nach Grüss und Jungk üben Asparagin und Säuren einen günstigen Einfluss aus.

Brown und Morris (Journ. of. Chem. Soc. 1890) geben ebenfalls an, dass die Zugabe kleiner Mengen von Säuren die Wirkung fördert.

Nach Ford (Wochsch. f. Br. 1904 S. 525) ist die Zunahme durch Säuren auf die neutralisierende Wirkung von Alkali zurückzuführen. Asparagin begünstigt die Tätigkeit der Diastase nur vermöge seiner sauren Eigenschaften, was aber Effront entschieden in Abrede stellt.

Die verzuckerungsfördernde Wirkung der Kohlensäure hat O. Mohr nachgewiesen.

In neuerer Zeit haben Lintner und Wirth (Dissertation 1909) auch den günstigen Einfluss der im Malzauszug enthaltenen anorganischen und organischen Salze festgestellt.

Spärlich sind dagegen die Arbeiten, welche das Verflüssigungsvermögen in dieser Hinsicht untersucht haben. Im Handbuch der Spiritusfabrikation von Maercker findet sich sogar die Notiz, dass alle Körper, die das Verzuckerungsvermögen fördern, ohne Einfluss auf die Verflüssigung seien.

Dagegen haben Fernbach und Wolff (Wochschr. f. Br. 1907 S. 519) gefunden, dass das Verflüssigungsvermögen am kräftigsten arbeitete, wenn gegen Methylorange genaue Neutralität vorhanden war. Ausserdem haben die genannten Forscher den Einfluss verschiedener Salze, wie $MgSO_4$, $CaSO_4$, $BaCl_2$, $CaCl_2$, NaCl studiert und beobachtet, dass nur das Bariumchlorid eine günstige Wirkung ausübe.

a) Einwirkung von Salzen.

Der Zweck der untenstehenden Versuche ist nun, vor allem die Veränderungen festzustellen, denen das Verflüssigungsvermögen unterworfen ist, wenn es bei Anwesenheit dieses oder jenes Körpers in Tätigkeit tritt. In Untersuchung genommen wurden alle eben angeführten Salze Die Versuchsergebnisse sind in einer Tabelle zusammengestellt, aus welcher der Effekt der Diastasewirkung einmal an sich, ohne Zusatz von Stoffen, sodann unter dem Einfluss jener Körper in Mengen von 1 - 2% in der Zunahme der Verflüssigung ersehen werden kann.

Salz	Verflüssigungsvermögen vor der Zugabe	Verflüssigungsvermögen nach der Zugabe
NaCl	171,4	240,0
KCl	171,4	233,1
$CaCl_2$	329,5	377,1
$MgSO_4$	329,5	356,3
$BaCl_2$	329,5	426,5
$(NH_4)_3PO_4$	217,5	235,1
$MnSO_4$	217,5	248,5

Durch diese Resultate dürfte der Beweis erbracht sein, dass sämtliche von Wolff und Fernbach als indifferent bezeichneten Salze doch imstande sind, die verflüssigende Tätigkeit der Diastase zu

verstärken und zwar unter Umständen in bedeutendem Masse. Bei näherem Zusehen wird man weiter wahrnehmen, dass es vor allem die Chloride sind, die sich ganz besonders in dieser Hinsicht auszeichnen. Zum gleichen Ergebnis gelangte auch Schneidewind (Landw. Jahrb. 1906 S. 919), der die verzuckernde Kraft der Diastase in dieser Richtung untersuchte.

Im Einklang mit diesen Resultaten steht ausserdem ein Vegetationsversuch Nobbe's. Er fand, dass die chlorophyllhaltigen Organe einer unter Abwesenheit von Chloriden gezogenen Buchweizenpflanze mit Stärkekörnern ganz vollgepfropft waren, was bei Gegenwart von Chloriden nicht zu beobachten war. Daraus folgert er, dass infolge ungenügender Mengen an Chlor, die Wanderungsfähigkeit der Stärke fast ganz aufgehoben sei, dass nur die chlorhaltige Zellflüssigkeit die Stärkekörner in der Weise zu verändern vermag, wie es zu deren Transport nötig ist. Ferner ist er geneigt anzunehmen, dass das von ihm beobachtete Fehlschlagen der Blüten ebenfalls auf den Mangel an Chlor zurückzuführen sei, indem die in den Blättern assimilierte organische Substanz, wegen ihrer Unfähigkeit zu wandern, nicht dorthin gelangen kann.

Daraus würde man den Schluss ziehen können, dass vielleicht den Jonen des Chlors diese aktivierende Eigenschaft innewohnt. Die Bestätigung für diese Ansicht ist, was das Verzuckerungsvermögen tierischer Diastasen anbetrifft, von J. Wohlgemuth (Untersuchungen über die Diastase [Biochem. Zeitschr. 1908]) bereits erbracht, und jedenfalls kann dieses Ergebnis ohne Bedenken auch zur Erklärung obiger Erscheinung Verwendung finden. Wohlgemuth beobachtete nämlich, dass das Kochsalz auf die Verzuckerung der Speicheldiastase einen günstigen Einfluss äusserte und legte sich die Frage vor, welches Jon des Natriumchlorids die Förderung bewirke. Zur Beantwortung derselben ging er so vor, dass er zunächst auf ziemlich komplizierte Weise salzfreien Speichel herstellte und dann bestimmte, ob ein anderes Neutralsalz, bei dem sich die einzelnen Jonen gegen Natrium und Chlor austauschen lassen, die Diastase beeinflusst. Er nahm dazu KNO_3 und $NaNO_3$, die sich als völlig unwirksam erwiesen. KCl und NaCl dagegen zeigten gleich kräftig fördernden Einfluss.

Wenn man, wie dieses im vorliegenden Falle geschah, mit einem Malzauszug arbeitet, der neben den Enzymen auch eine Reihe anderer Körper enthält, so hat es natürlich ein gewisses Interesse, das Verhalten des Verflüssigungsvermögens gegenüber den nichtenzymatischen Stoffen kennen zu lernen. Zu diesem Zweck wurde ein Auszug durch kurzes Kochen unwirksam gemacht, von dem ausgeschiedenen Koagulum abfiltriert, nun nochmal zur Extraktion

einer bestimmten Malzmenge benützt und dann in gleicher Weise zur Untersuchung verwendet. Dabei ergab sich eine Erhöhung des Verflüssigungsvermögens von

$$V = 285{,}2 \text{ auf } V = 352{,}2.$$

Demnach auch hier eine beträchtliche Zunahme!

Um Versuchsfehler möglichst auszuschalten, wurde bei allen Versuchen in diesem Abschnitt immer ein völlig unveränderter Auszug mit herangezogen, der unter denselben Bedingungen hergestellt und gleichzeitig zur Anwendung kam, und so es möglich machte, genaue Vergleichsbestimmungen auszuführen.

Was nun die Erklärung aller dieser durch Salze hervorgerufenen günstigen Wirkungen anlangt, so nimmt Euler (a. a. O.) an, dass es sich in vielen Fällen um Konzentrationsveränderungen handeln wird, sei es, dass die Spaltprodukte und das Substrat mit diesen Stoffen in reversibler Weise zusammentreten, sei es, dass sie durch Nebenreaktionen verändert oder zerstört werden. Über die Art und Weise einer solchen Bindung oder Veränderung hat man jedoch noch keine sichere Vorstellung.

Tammann (Hoppe-Seyler 16) gelangt zur Überzeugung, dass im allgemeinen die Spaltprodukte die Vollständigkeit der enzymatischen Reaktion beeinträchtigen.

Nach dieser Annahme ist die obige Behauptung von einer Bindung der Spaltprodukte und der dadurch bedingten Unwirksamkeit derselben leicht verständlich.

Ausser den aktivierenden Stoffen gibt es auch solche, welche die diastatische Wirkung hemmen und ganz aufheben. Zu diesen gehören die als Gifte für jedes lebende Wesen bekannten Salze, so z. B. Quecksilber-, Arsen- und Bleisalze, ferner die meisten Schwermetallsalze. Nur das Mangan scheint eine Ausnahmestellung einzunehmen; es ist nach den vorhandenen Tatsachen zu schliessen, ein für biologische Prozesse sehr wichtiges Metall. So hat Bertrand festgestellt, dass Mangan ein wesentlicher Bestandteil der Oxydasen ist. Ferner wird, wie Hoyer (Chem. Zentrbl. 1905 II 582) gefunden hat, die Fettspaltung durch pflanzliche Lipasen durch geringe Mengen von Mangansulfat begünstigt. Auch die diastatischen Enzyme des Serums und des Pankreassaftes werden, wie T. Rosenberg (Skand. Arch. f. Physiologie 20) nachweisen konnte, schon durch geringe Mengen desselben Salzes zur kräftigen Wirksamkeit angeregt. Ebenso konnte im obigen Versuche eine günstige Beeinflussung der verflüssigenden Wirkung konstatiert werden.

Zu den inaktivierenden Stoffen gehören vor allem auch die alkalisch und sauer reagierenden Salze und besonders die Laugen

und Säuren selbst. Diese sollen nun im Folgenden hinsichtlich ihrem Verhalten zu den diastatischen Roggenenzymen zum Gegenstand unser Untersuchungen gemacht werden.

b) Einwirkung von Alkalien

Bezüglich der Einwirkung alkalisch-reagierender Stoffe auf pflanzliche Diastase, finden sich in der Literatur noch wenige, meist ganz allgemein gehaltene, zum Teil sich widersprechende Angaben. Darüber ist man sich allerdings völlig klar, dass ein enzymatischer Vorgang selbst in schwachalkalischem Medium nicht möglich ist und erklärt dieses damit (vgl Grützner: Pflüg. Arch. 76 S. 304), dass die offenbar für die diastatische Wirkung erforderlichen, freien Wasserstoffjonen durch die freien Hydroxyljonen gebunden und dadurch unwirksam werden. Wird nun diese alkalische Reaktion durch Neutralisation mit einer Säure wieder beseitigt, so soll die ursprünglich vorhandene Aktivität wieder völlig hergestellt werden. (Vgl. Euler: Allgem. Chemie der Enzyme S. 114.)

So ganz allgemein gilt diese Behauptung jedoch nicht. Die Zugabe von Alkalien wird nach Fernbach und Hubert (Compt. rend. 81 S. 293) nicht jede Enzymwirkung aufheben, solange noch primäre Phosphate zugegen sind. Sie wird aber doch sogleich nachteilig wirken, da die letzteren dadurch in sekundäre und normale Salze umgewandelt werden. Ein etwas grösserer Zusatz, als zur Überführung der primären, in sekundäre Salze erforderlich ist, wird die Inaktivierung der enzymatischen Hydrolyse bewirken, die jedoch durch Neutralisation wieder rückgängig gemacht werden kann; noch grössere Quantitäten hemmen nicht nur, sondern schädigen und töten sogar in ausgesprochenem Masse, ohne dass von einer etwaigen Regenerierung gesprochen werden kann.

Man hat infolgedessen bei der Einwirkung der Alkalien auf diastatische Pflanzenenzyme zwei verschiedene Veränderungen, denen die Enzymsubstanz unterworfen werden kann, zu unterscheiden; nämlich einen reversiblen Einfluss, der sich dahin geltend macht, dass die fermentative Tätigkeit bereits durch Spuren freien Alkalis beeinträchtigt, ja unmöglich wird, durch Neutralisation aber wieder reaktiviert werden kann, und einen irreversiblen, der durch stärkere Konzentration freier Hydroxylgruppen veranlasst wird, aber infolge der dadurch hervorgerufenen tiefgreifenden Veränderungen nicht mehr einer Reversion fähig ist.

Zwischen beiden Prozessen steht ein Vorgang, bei dem nur eine teilweise Vernichtung der enzymatischen Eigenschaften Platz greift, weshalb auch nur eine dementsprechende Wiederherstellung möglich ist.

Diese Prozesse sollen im Folgenden durch Versuche näher

charakterisiert, insbesondere soll die Abhängigkeit der Hemmung, Schädigung und Vernichtung der Enzyme und deren Wirkung von der Konzentration und der Zeit, während welcher dieselben mit dem Alkali in Berührung sich befinden, eingehender untersucht werden.

Zur Prüfung wurden hauptsächlich herangezogen ein Alkalimetallkarbonat (Soda) und ein Alkalimetallhydroxyd (Natronlauge); in geringerer Menge auch Natriumbikarbonat. Bei der Versuchsanstellung wurde ausgegangen für die Soda von einer 10prozentigen Lösung, für Natronlauge von einer Zehntelnormallösung. Zum Vergleich wählte man auch wieder etwas stärkere Konzentrationen.

1. Soda.

Um nun die in der Literatur vorhandenen Angaben nachzuprüfen und um ferner über die Art und Weise der Einwirkung von Alkalien mehr Klarheit zu erlangen, wurden nachfolgende Versuche angestellt:

1. Vor allem war es nötig, die verzuckernde Kraft eines Malzauszuges festzustellen, der ohne jeglichen Zusatz geblieben ist. Sie betrug bei einem 5prozentigen Auszug nach Lintner-Wirth bestimmt:

$$F = 172{,}5 \text{ g Maltose.}$$

2. Wurde ein Malzauszug für ganz kurze Zeit mit Sodalösung (0,5 ccm einer 10%-Lösung zu 10 ccm Auszug), bis zur schwachalkalischen Reaktion (Phenolphtalein als Indikator) versetzt, dann aber sofort mit einer der zugefügten Menge Soda entsprechenden Menge Essigsäure neutralisiert. Die nunmehr festgestellte saccharifizierende Kraft betrug:

$$F = 168{,}0 \text{ g Maltose.}$$

Daraus lässt sich ersehen, dass durch eine nur vorübergehende schwache Alkalinität der Enzymlösung, deren verzuckernde Kraft nicht empfindlich geschädigt wird.

3. Ganz anders gestaltet sich das Bild, wenn man dieselbe Alkalität anwendet, aber die Einwirkungsdauer, d. h. die Zeit, während welcher das Enzym dem Einfluss des freien Alkalis ausgesetzt ist, variiert. Selbstverständlich wurde nach Ablauf der festgesetzten Zeit durch die entsprechende Menge Essigsäure wieder neutralisiert. Es ergab sich hier ein Verzuckerungsvermögen

nach 5^h von $F = 108{,}9$ g Maltose
nach 14^h „ $F = 45{,}0$ g „

Gegenüber dem unveränderten Auszug ist eine beträchtliche Abnahme zu beobachten, die mit der Einwirkungsdauer des Alkalis zunimmt.

Nachdem diese Versuche dargelegt hatten, dass bei Anwesenheit geringer Mengen freien Alkalis eine sehr starke Abschwächung, wenn nicht geradezu eine vollständige Aufhebung des Fermentativvermögens stattfindet, ging man dazu über den Einfluss der Soda auf die diastatischen Roggenenzyme weiter zu verfolgen und zwar in erster Linie die Abhängigkeit der Schädigung von der Menge des zugefügten Alkalis zu bestimmen.

Die Versuche wurden in der Weise angestellt, dass zu je 10 ccm Auszug die entsprechende Menge Alkali gegeben wurde. Nach Ablauf einer bestimmten Zeit wurde neutralisiert bis zur schwachsauren Reaktion (Indikator: Lakmus). Um ausserdem in allen Proben die gleiche Verdünnung zu erhalten, wurde dem grösseren Zusatz von Alkali und Essigsäure in der einen Probe, die entsprechende Menge Wasser den andern hinzugefügt.

Versuch 1.

5prozentiger Roggenmalzauszug. a) 5^{h} Einwirkungsdauer.

10 ccm Auszug	5 ccm Zuckerlösung entsprechen:
+ 0,6 ccm Sodalösung	1,0 ccm Fehlingsche Lösung
+ 0,9 „ „	0,55 „ „ „
+ 1,2 „ „	0,35 „ „ „

b) 16^{h} Einwirkungsdauer.

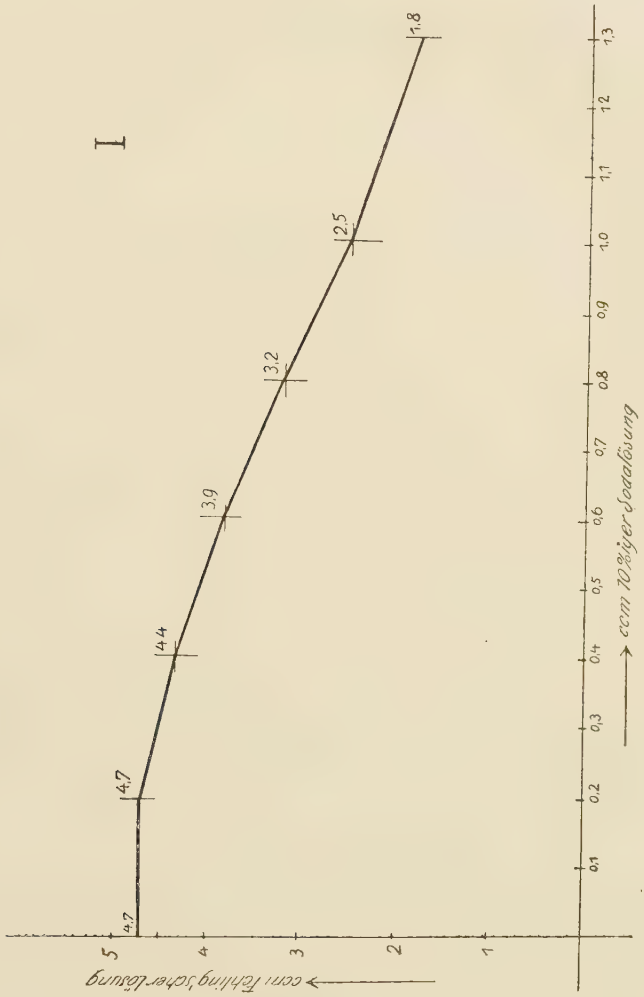
10 ccm Auszug	5 ccm Zuckerlösung entsprechen:	5 ccm Fehlingsche Lösung entsprechen:
+ 0,4 ccm Sodalösung	1,05 ccm Fehlingsche Lösung	24,0 ccm Zuckerlösung
+ 0,5 „ „	0,92 „ „ „	27,4 „ „
+ 0,8 „ „	0,65 „ „ „	38,5 „ „
+ 1,0 „ „	0,45 „ „ „	55,5 „ „
+ 1,5 „ „	0,25(?) „ „ „	98,5(?) „ „

Versuch 2.

10% Roggenmalzauszug. 16h Einwirkungsdauer.
Indikator: Methylorange!

10 ccm Auszug	5 ccm Fehlingsche Lösung entsprechen:	5 cm Zuckerlösung entsprechen:	Verflüssigungsvermögen V=
+ 0 ccm Sodalösung	5,2 ccm Zuckerlösung	4,7 ccm Fehlingsche Lösung	166,6
+ 0,2 „ „	5,3 „ „	4,7 „ „ „	166,6
+ 0,4 „ „	5,6 „ „	4,4 „ „ „	125
+ 0,6 „ „	6,4 „ „	3,9 „ „ „	125
+ 0,8 „ „	7,8 „ „	3,2 „ „ „	125
+ 1,0 „ „	9,8 „ „	2,5 „ „ „	100
+ 1,3 „ „	13,6 „ „	1,8 „ „ „	83,3

Die Ergebnisse dieses Versuches sind, was das Verzuckerungsvermögen anlangt, in nachfolgender Kurve graphisch zum Ausdrucke gebracht.



Die Kurve nähert sich anscheinend einer Geraden, was dahin erklärt werden könnte, dass die Abnahme der fermentativen Wirkung proportional den zugesetzten Mengen Alkali erfolgt. Weitere Beweise für die Richtigkeit dieser Annahme werden jedoch noch zu bringen sein.

Es lag nahe einmal die Veränderungen der diastatischen Wirksamkeit festzustellen, wenn man den Alkalizusatz überall gleichstark bemisst und nur die Einwirkungsdauer variiert.

Zu jeder Probe (10 ccm Auszug) wurde 1 ccm Sodalösung ge-

geben und nach Ablauf der festgesetzten Zeit mit der entsprechenden Menge Essigsäure neutralisiert, unter Anwendung von Methylorange als Indikator.

Die Versuche lieferten folgende Resultate:

Einwirkungsdauer	5 ccm Zuckerlösung entsprechen:	5 ccm Fehlingsche Lösung entsprechen:	Verflüssigungsvermögen V–
1 h	3,80 ccm Fehlingsche Lösung	6,5 ccm Zuckerlösung	100
3 h	3,35 „ „ „	7,4 „ „	83
5 h	3,30 „ „ „	7,5(?) „ „	83
8 h	2,95 „ „ „	8,5 „ „	71
14 h	2,50 „ „ „	9,5 „ „	62
23 h	2,30 „ „ „	11,2 „ „	55,5
40 h	2,0 „ „ „	12,4 „ „	12(?)

Die entsprechende graphische Darstellung, siehe weiter unten!

2. Versuche mit Natronlauge.

Von Anfang an war es klar, dass Natronlauge energischer die Enzyme beeinflussen werde, als Soda, weshalb die ersten Versuche mit $\frac{n}{2}$ Natronlauge ausgeführt wurden. Doch zeigte sich sehr bald, dass selbst diese Konzentration noch zu stark abschwächend einwirkte, um die Versuchsanstellung in ähnlicher Weise zu gestalten, wie mit Sodalösung. Eine nur vorübergehende Alkalität von 1% verursachte hier im Gegensatz zu einer gleichstarken Sodalösung, eine so beträchtliche Abschwächung, dass überhaupt keine diastatische Wirkung mehr zu konstatieren war. — Durch eine Reihe von Vorversuchen hat sich herausgestellt, dass die Verwendung einer $^1/_{10}$ n Natronlauge für unsere Zwecke genügte.

Die Anordnung und Ausführung der Bestimmungen war jener mit Soda völlig analog:

An Resultaten ergab sich:

(Siehe Tabelle auf nächster Seite!)

Einwirkungsdauer 16 h.

10 ccm Auszug	5 ccm Zuckerlösung entsprechen:	Verflüssigungs-vermögen V=
+ 1 ccm $\frac{n}{10}$ NaOH	4,0 ccm Fehlingsche Lösung	200
+ 1,5 „ „ „	3,75 „ „ „	166,6
+ 2,0 „ „ „	3,25 „ „ „	166,6
+ 2,5 „ „ „	3,0 „ „ „	142,8
+ 3,0 „ „ „	2,75 „ „ „	125
5,0 „ „ „	1,5 „ „ „	50
+ 6,0 „ „ „	0,75 „ „ „	20
+ 6,5 „ „ „	0,5 „ „ „	11
+ 0 „ „ „	4,2 „ „ „	200

Die Ergebnisse dieser Versuche sind ebenfalls wieder in nachfolgender Tabelle II in ihren Hauptzügen zur Anschauung gebracht. Es bezeichnet die Abszisse die Mengen der zugefügten $\frac{n}{10}$ Na OH in ccm, während die Ordinate jene der Zuckerlösung darstellt, welche nötig waren die Fällung von 5 ccm Fehlingscher Lösung zu bewirken.

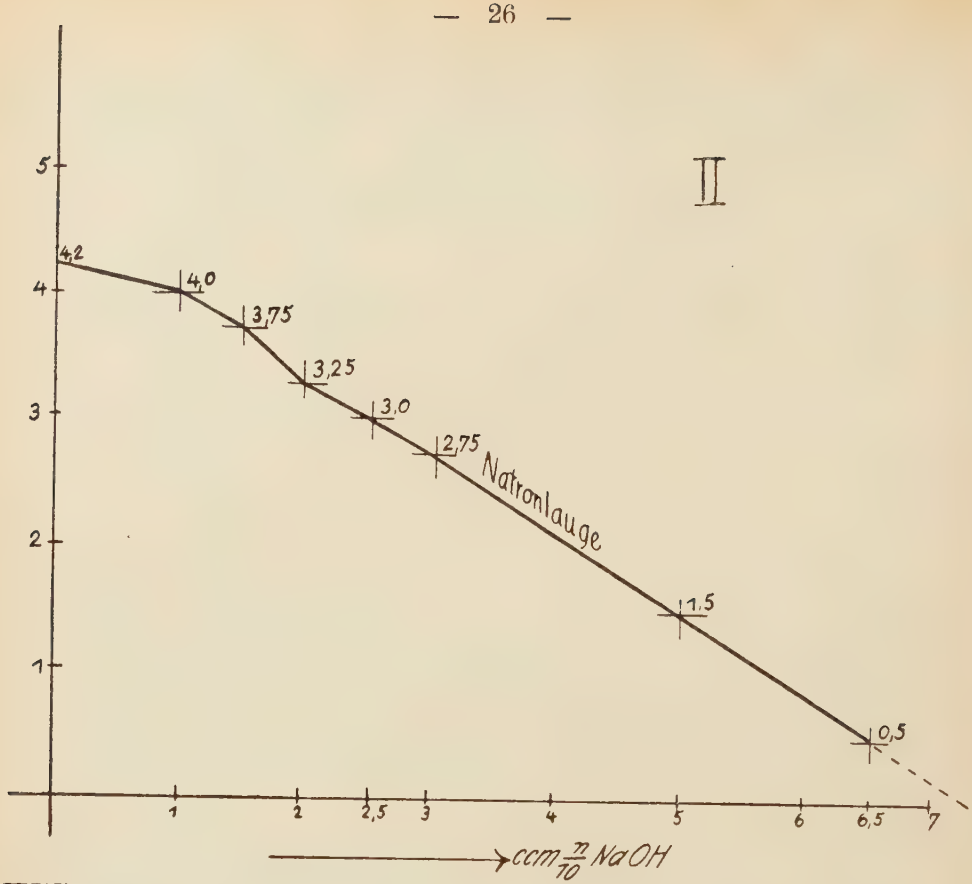
Hinsichtlich der Veränderung der Einwirkungszeit ergibt sich folgendes:

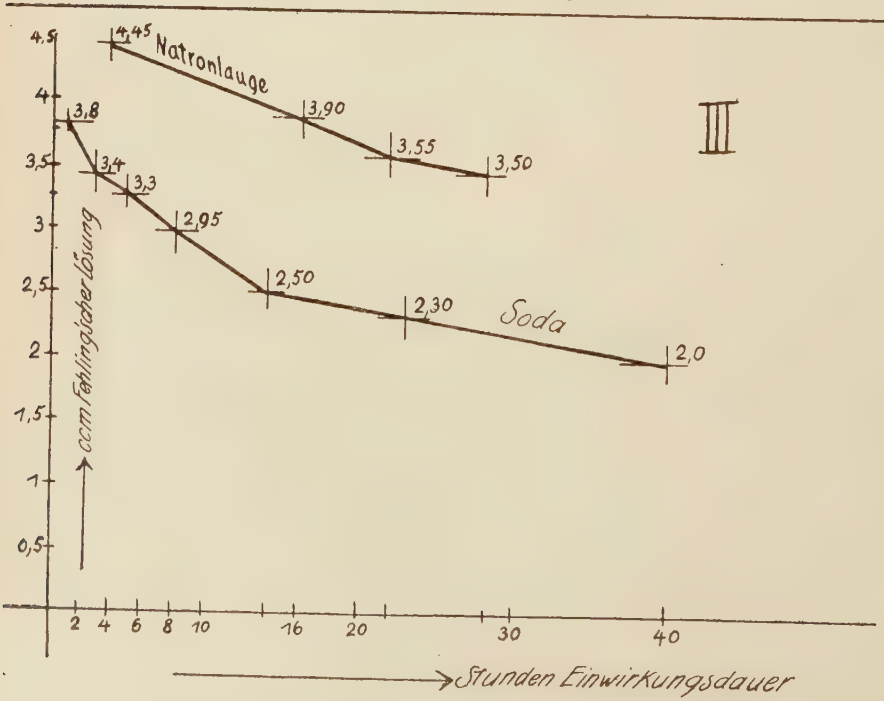
Je 10 ccm Auszug wurden mit 2 ccm $\frac{n}{10}$ NaOH versetzt.

Einwirkungszeit	5 ccm Zuckerlösung entsprechen:	Verflüssigungs-vermögen
4 h	4,45 ccm Fehlingsche Lösung	250
16 h	3,90 „ „ „	200
22 h	3,55 „ „ „	125
28 h	3,50 „ „ „	125

3. Erheblich schwächer als die beiden genannten Stoffe wirkt Natriumbikarbonat auf die Enzyme ein, was ja weiter nicht wundernehmen darf, wenn die Annahme Grützners (vgl. oben!) Geltung hat, dass die Entfaltung der enzymatischen Kraft von der Konzentration der freien Hydroxyljonen abhängig ist. Hier erwies sich eine 16stündige Digestion in 1prozentiger Lösung und nachfolgender Neutralisation, ohne Einfluss. Selbst in 3prozentiger Lösung, während 15 Stunden, ergab sich nur eine verhältnismässig geringe Abschwächung. Es betrug das Verzuckerungsvermögen

ohne Alkalizusatz F = 167,5 g Maltose,
mit „ F = 161,2 g „


II
4,2
4,0
3,75
3,25
3,0
2,75
Natronlauge
1,5
0,5
5
4
3
2
1
1
2
2,5
3
4
5
6
6,5
7
ccm n/10 NaOH


III
4,45
Natronlauge
3,90
3,55
3,50
3,8
3,4
3,3
2,95
2,50
2,30
Soda
2,0
ccm Fehlingscher Lösung
4,5
4
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
2
4
6
8
10
16
20
30
40
Stunden Einwirkungsdauer

Verfolgen wir nun den Verlauf der Kurven, so bemerken wir eine mit steigender Konzentration und wachsender Einwirkungsdauer zunehmenden schädigenden Einfluss auf die Wirkung des verzuckernden Enzyms und zwar derart, dass dieser der Alkalimenge und der Einwirkungszeit fast ganz proportional verläuft. Denn die aus den obigen Zahlen gezeichneten Kurven nähern sich fast durchwegs mehr oder minder einer Geraden. Von einer ganz genauen Übereinstimmung kann naturgemäss keine Rede sein, da ja bei Ausführung der Versuche immer kleine Versuchsfehler unterlaufen, die das Resultat aber dennoch bedeutend verändern können.

Bei näherer Betrachtung der in Tabelle I und II dargestellten Kurven sieht man, dass der erste Abschnitt derselben mit dem weiteren Verlauf nicht konform ist, was wohl seinen Grund darin hat, dass die anfänglich zugesetzten geringen Mengen Alkali zuerst neutralisierend auf die in jedem Malzauszug enthaltenen Säuren (Milchsäure) und sauren Salze (primäre Phosphate) einwirken und die übriggebliebene geringe Menge doch noch zu schwach ist, um eine merkliche proportionale Wirkung zu äussern.

Was ferner das Verflüssigungsvermögen anlangt, so erfährt auch dieses eine fortschreitende Abschwächung, welche aber scheinbar keiner bestimmten Gesetzmässigkeit folgt. Hieraus auf ein besonders verflüssigendes Enzym schliessen zu wollen, wäre verkehrt. Vielmehr muss die Ursache wieder in der geringeren Empfindlichkeit der Arbeitsmethode, gegenüber jener der Verzuckerungsbestimmung gesucht werden, welche eben nicht gestattet, so geringe Unterschiede, wie sie hier in Betracht kommen, sicher nachzuweisen.

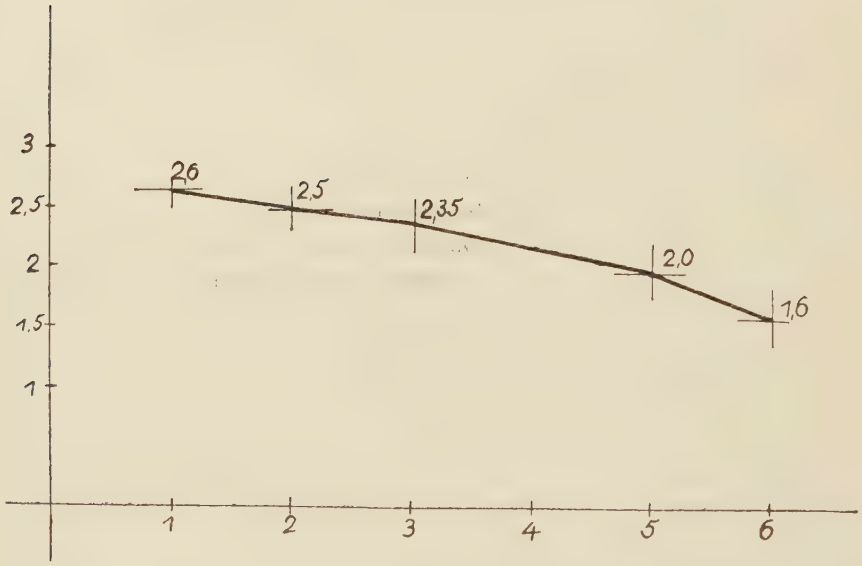
Nachdem diese Versuche zum Teil recht merkwürdiges Material zu Tage gefördert hatten, indem sie darlegten, dass die Einwirkung von Alkalien auf das Verzuckerungsvermögen eines Roggenmalzextraktes fast ganz proportional vor sich geht, war es nicht uninteressant zu ermitteln, ob dieses Verhalten nur eine Eigentümlichkeit der Roggenmalzdiastase oder ob Diastasen anderen Ursprungs z. B. Gerstenmalzdiastase ähnliche Eigenschaften besitzen würden.

Sehr bald zeigte sich hier, dass Gerstendarrmalzdiastase gegenüber Alkalien empfindlicher war; denn 3 ccm $\frac{n}{10}$ NaOH während einer 16stündigen Einwirkungsdauer vernichteten die Fermentwirkung bereits vollständig. Die Versuche mussten infolgedessen mit $\frac{n}{30}$ NaOH vorgenommen werden. Die Versuchsanstellung war die übliche. Es ergaben sich folgende Resultate:

(Siehe Tabelle auf nächster Seite!)

Einwirkungsdauer 16 Stunden!

10 ccm Auszug	5 ccm Zuckerlösung entsprechen:
+ 1 ccm $\frac{n}{30}$ NaOH	2,6 ccm Fehlingscher Lösung
+ 2 „ „ „	2,5 „ „ „
+ 3 „ „ „	2,35 „ „ „
+ 5 „ „ „	2,0 „ „ „
+ 6 „ „ „	1,6 „ „ „



Die aus den Versuchswerten gezeichnete Kurve lässt einen ähnlichen Verlauf erkennen, wie jene der diesbezüglichen Versuche mit Roggenmalzdiastase.

In Anbetracht dieser Übereinstimmung besteht wohl hinsichtlich der Identität der beiden Diastasen kein Zweifel mehr, obwohl die grössere Empfindlichkeit der Gerstenmalzdiastase das Gegenteil vermuten liess. Doch wird diese Verschiedenheit leicht verständlich, wenn man in Erwägung zieht, dass nicht Gerstengrünmalz, sondern helles Darrmalz zur Verwendung kam, dessen Diastase eben durch den Darrprozess geschwächt und an Widerstandskraft gegen äussere Einflüsse eingebüsst hatte.

Angesichts der interessanten Ergebnisse der Alkalieinwirkung auf das Verzuckerungs- und Verflüssigungsvermögen, war es angebracht auch jene Veränderungen der diastatischen Tätigkeit der Enzyme in den Kreis unserer Betrachtung zu ziehen, welche sich abspielen, wenn man eine Säure in gleicher Weise wie das Alkali zur Anwendung bringt. Dabei überzeugte man sich gleich anfangs von der weit grösseren Empfindlichkeit der Enzyme gegenüber Säuren, als gegen Alkalien. c) Einwirkung von Säuren.

Allgemein bekannt und früher auch bereits erwähnt ist die Tatsache, dass geringe Mengen freier Säuren die Verzuckerung fördern. Die Begründung dieser Erscheinung hat Anlass zu den verschiedensten Anschauungen gegeben, wovon einige kurz skizziert sein sollen:

Nach Ford (Wochschr. f. Br. 1904 S. 525) ist die Zunahme durch Säuren auf die neutralisierende Wirkung von Alkali zurückzuführen.

John erklärt die Erscheinung durch Bindung der Säure.

Grützner (Pflüg. Arch. 76 S. 304) schreibt die Schuld den freien Wasserstoffjonen zu und erinnert an die Wirkung der Säure bei der Inversion von Rohrzucker, wobei sie die Rolle eines beschleunigenden Katalysators spielt.

Fernbach und Hubert (Compt. rend. 81 S. 293) endlich glauben den günstigen Einfluss einer Säure dahin erklären zu müssen, dass die in jedem Malzauszug vorhandenen sekundären Phosphate durch die Säure in primäre umgewandelt werden, welche das Fermentativvermögen fördern. Das Optimum des Zuckerbildungsvermögens würde demnach dann erreicht sein, wenn sämtliche sekundären Phosphate in primäre umgewandelt seien, wenn also gegenüber Methylorange vollkommene Neutralität herrsche.

Es dürfte wohl bekannt sein, dass ein frischbereiteter Malzauszug auf die gewöhnlichen Indikatoren Lakmus und Phenolphtalein sauer reagiert, so dass wie weiter oben bereits angegeben auf 10 ccm Auszug zur Neutralisation ca. 0,3 ccm $\frac{n}{10}$ NaOH verbraucht werden; während derselbe Auszug auf Methylorange als alkalisch bezeichnet werden muss, so dass hier auf 10 ccm Extrakt ca. 1 ccm $\frac{n}{10}$ HCl zugefügt werden müssen, um die Neutralität zu erzielen. Doch darüber, ob dieses Verhalten auf die Gegenwart einer freien Säure oder auf die Anwesenheit eines sauren Salzes zurückgeführt werden kann, sind sich die Forscher noch nicht einig. (Vgl. Ott: Zeitschr. f. d. ges. Brw. 20, 633—636 und Hubert und Fernbach a. a. O.)

Die hierüber angestellten Versuche weisen, was das Zuckerbildungsvermögen anbetrifft, mit der Anschauung Fernbachs und Huberts völlige Übereinstimmung auf. Man ging so vor, dass einmal in einem unveränderten Auszug Verzuckerungs- und Verflüssigungs-

vermögen bestimmt und die erhaltenen Werte mit jenen, eines auf Methylorange und eines auf Phenolphtalein neutralen Auszuges, verglichen wurden.

Es wurden folgende Resultate erhalten:

Verzuckerungsvermögen eines unveränderten
Auszuges . . . . . F = 174,0 g Maltose,
F eines auf Methylorange neutralen Auszuges = 193,1 „ „
F eines auf Phenolphtalein „ „ = 96 „ „

In dem auf Methylorange neutralen Auszug war die fermentative Kraft doppelt so gross, als in jenem auf Phenolphtalein neutralen Extrakt. Auch gegenüber dem ursprünglichen war eine geringe Zunahme zu verzeichnen.

Dagegen war das Verflüssigungsvermögen in den drei Fällen gleich stark oder höchstens ganz wenig verschieden. Hieraus erklären sich auch die negativen Resultate der früher angestellten Versuche, nämlich als es galt zu prüfen, wie und in welchem Masse die Zunahme der Verflüssigung, während der verschiedenen Extraktionszeiten und Extraktionstemperaturen, von der Säuremenge abhängig ist. Dort wurde der Misserfolg der Ungenauigkeit der Arbeitsmethode zugeschrieben, was aber hier ausgeschlossen ist, da eine Ab- oder Zunahme der verflüssigenden Kraft, wenn sie gleich jener der verzuckernden um die Hälfte betragen würde, auch mit dieser Methode sicher nachgewiesen werden könnte.

Demnach folgt hier anscheinend das Verflüssigungsvermögen anderen Gesetzen, als jenes der Verzuckerung, — ein Umstand, der auf die Existenz zweier Enzyme schliessen lässt. An einen sicheren Beweis für die Gegenwart zweier Enzyme muss allerdings die Bedingung geknüpft sein, dass sich die beiderseitige Wirkung völlig unterscheiden lasse, in welcher Beziehung diese Beobachtungen leider nicht ausreichen. Doch lässt diese Tatsache mit jenen Beweisen, wie sie von den Verfechtern der Zwei-Enzymtheorie ins Feld geführt werden, vereint die obige Vermutung mit einem gewissen Recht aussprechen. Vollkommen stichhaltige Beweise fehlen ja bis jetzt auf beiden Seiten.

Nach diesen mehr orientierenden Versuchen war es wohl am Platze, gleichwie bei der Einwirkung von Alkalien die Veränderungen in der diastatischen Kraftentfaltung bei Zusatz grösserer Mengen einer Säure zu studieren und zwar wie dort, in bezug auf Säurekonzentration und Einwirkungsdauer.

Durch eine Reihe von Vorversuchen war zuerst wieder eine passende Verdünnung zu ermitteln. Dabei stellte sich die Verwendung von $\frac{n}{30}$ H Cl als zweckmässig heraus. Die Anordnung der Versuche war die übliche. Die Ergebnisse waren folgende:

1. Bei verschiedener Einwirkungszeit.

a) Angewandt je 10 ccm Auszug, mit je 4 ccm $\frac{n}{30}$ HCl versetzt; sodann neutralisiert (Methylorange als Indikator).

Einwirkungsdauer	5 ccm Zuckerlösung entsprechen:	Verflüssigungsvermögen V=
1 h	2,5 ccm Fehlingsche Lösung	50
4 h	2,0 „ „ „	33,3
5 h	2,25 „ „ „	16,6
16 h	2,40 „ „ „	10,0
24 h	2,35 „ „ „	8,2
54 h	2,20 „ „ „	5,5
60 h	2,20 „ „ „	nicht mehr nachweisbar.

Verflüssigungsvermögen des ursprünglichen Auszuges (ohne Säure, aber 4 ccm Wasser) = 125.

b) Ein anderer Auszug gelangte zur Benützung.

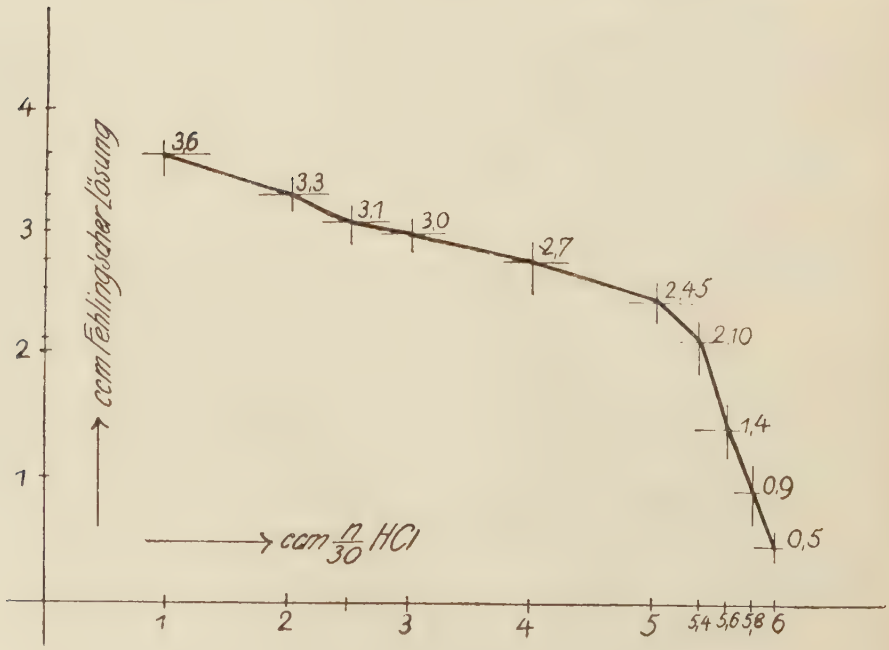
Einwirkungsdauer	5 ccm Zuckerlösung entsprechen:	Verflüssigungsvermögen V=
1 h	2,9 ccm Fehlingsche Lösung	40,0
6 h	3,0 „ „ „	16,6
24 h	2,95 „ „ „	10,0
48 h	2,95 „ „ „	8,0
72 h	2,25 „ „ „	0
ohne Säurezusatz	3,25 „ „ „	166

2. Bei verschiedenem Säurezusatz.

Einwirkungsdauer 16 h.

10 ccm Auszug	5 ccm Zuckerlösung entsprechen:	Verflüssigungs-vermögen:
+ 1 ccm $\frac{n}{30}$ HCl	3,6 ccm Fehlingsche Lösung	125,0
+ 2 „ „ „	3,3 „ „ „	100
+ 2,5 „ „ „	3,1 „ „ „	50
+ 3,0 „ „ „	3,0 „ „ „	16,6
+ 4,0 „ „ „	2,7 „ „ „	12,5
+ 5,0 „ „ „	2,45 „ „ „	3,6
+ 5,4 „ „ „	2,10 „ „ „	nicht mehr nachweisbar
+ 5,6 „ „ „	1,4 „ „ „	„ „ „
+ 5,8 „ „ „	0,9 „ „ „	„ „ „
+ 6,0 „ „ „	0,5 „ „ „	„ „ „

Die erhaltenen Werte sind, was das Verzuckerungsvermögen anlangt, in folgender Kurve veranschaulicht:



Der Verlauf der Kurve zeigt hier im Vergleich zu jener der Alkalieinwirkung Verschiedenheiten. Wohl besteht auch anfangs die Neigung zu einer gewissen Proportionalität in der Annäherung an die Gerade, doch lässt der schroffe Abfall gegen Ende der Fermentwirkung eine solche Annahme nicht zu. Somit scheint hier ein Unterschied zwischen dem Einfluss von Säure und Alkali zu bestehen, der aber noch grösser wird, wenn man die Versuchswerte der ersten Reihe genauer betrachtet und mit jenen der Alkalieinwirkung vergleicht. Während im letzteren Falle auch hier eine gewisse Gesetzmässigkeit in der Abnahme der Verzuckerung zu erkennen ist, liegen die Verhältnisse beim Säureeinfluss ganz anders. Das Verzuckerungsvermögen bleibt annähernd längere Zeit hiedurch auf derselben Höhe, die etwaige Abnahme ist ausserdem unregelmässig und im Verhältnis zur obigen unbedeutend. Dagegen nimmt eigentümlicher Weise die verflüssigende Kraft an Intensität erheblich ab, so dass nach einer 60—70stündigen Einwirkung eine Verflüssigung mit der zur Verfügung stehenden Arbeitsmethode nicht mehr nachweisbar ist. Wie eingangs bereits erwähnt, wurde zu allen Bestimmungen die nach Angabe Chrzaczsz' verfeinerte Lintner-Sollied-Methode benützt; aber trotzdem dieselbe als die empfindlichste gelten kann, konnte mir ein Nachweis einer Verflüssigung in diesem Falle nicht gelingen. Dass dieser, für die allgemein herrschende Anschauung recht sonderbaren Beobachtung anfänglich mit einem gewissen Misstrauen entgegengetreten wurde, dürfte ohne weiteres klar sein; mehrere Kontrollversuche bestätigten das Ergebnis jedoch zu wiederholtem Male.

Aus den Versuchsergebnissen folgt ferner die merkwürdige Tatsache, dass die beiden genannten Eigenschaften des in Rede stehenden Enzyms, gegenüber ein und demselben äusseren Faktor ein verschiedenes Verhalten zeigen, dass das Verflüssigungsvermögen von Säuren rascher zerstört wird, als die saccharifizierende Kraft.

Dieses verschiedene Verhalten führt nun neuerdings zur Vermutung, dass die beiden spezifischen Fähigkeiten der Diastase auch verschiedenen Fermenten eigen sind; wenigstens lässt der gegenwärtige Stand unserer diesbezüglichen Kenntnisse keine andere Erklärung zu. Oder sollte die mutmassliche Annahme F. Weis' (Zeitschr. f. d. ges. Brw. 1903) der für das Vorhandensein zweier proteolytischer Enzyme eintritt, Geltung haben? wenn er schreibt:

„Es liesse sich wohl denken, dass ein und dasselbe Enzym verschiedene Wirkungen ausüben könnte, d. h. mehrere verschiedene Moleküle zu zerteilen vermöchte (wie solches vom Myrosin und Emulsin bekannt ist)." „Aber," fährt er dann mit Recht weiter,

„wenn der Abbua eines Moleküls ganz anderen Gesetzen unterworfen ist, als der Abbau eines andern Moleküls, oder, wenn ein Malzauszug bei verschiedener Einwirkung von aussen her das Vermögen, eine gewisse Art von Zerteilung zu bewirken vollständig oder beinahe vollständig verliert, während seine übrigen Funktionen fast ungeschwächt bleiben, so wird es wohl ganz natürlich sein, die Erklärung darin zu suchen, dass irgend ein Enzym durch diesen äusseren Faktor zerstört oder abgeschwächt wird, während das andere weniger stark beeinflusst wird.“

Allerdings genügt das Tatsachenmaterial noch nicht, um eine endgültige Entscheidung in diesem Sinne herbeizuführen; „denn,“ so schreibt Chrzaczsz (Zeitschr. f. Spiritusind. 1909 Nr. 45 – 50), einer der entschiedensten Gegner der Zwei-Enzymtheorie, „wenn man die Anwesenheit einer besonderen stärkeverflüssigenden Kraft annimmt, so folgt daraus, dass diese Kraft sich während der Verzuckerung in irgend einer Weise kundgibt.“ Seine Untersuchungen zeigen aber in keinem Falle einen Unterschied in der Verzuckerung der löslichen Stärke und des Stärkekleisters. Daraus zieht er den etwas kühnen Schluss, dass die verflüssigende Kraft an die verzuckernde gebunden ist; sie beschleunigt nur die Energie ihrer Wirkung.

Nach meiner Ansicht sind seine Versuche aber gar nicht dazu angetan, hier Aufklärung zu verschaffen; denn seine Behauptung stützt sich anscheinend einzig und allein auf die schon längst bekannte Tatsache, dass die Verzuckerung von Stärkekleister bei Anwendung von Malzextrakt rascher und intensiver vor sich geht, als dieses mit Hilfe von Auszügen ungekeimten Getreides der Fall ist; — ein Vorgang, den er ganz allein auf die Anhäufung der stärkeverflüssigenden Kraft zurückführt. Er schreibt nämlich wörtlich:

„Die Amyloseextrakte, welche ein grösseres Lösungsvermögen besitzen (aus Malz), bauen die Stärke viel schneller ab, im Gegensatz zu den Extrakten des ungekeimten Getreides, welche nur eine schwache verflüssigende Kraft haben.“

Aber man muss doch berücksichtigen, dass mit der Zunahme der verflüssigenden Kraft im keimenden Getreidekorn, auch jene der Verzuckerung, der Eiweissspaltung u. dgl. Hand in Hand geht, weshalb die intensivere Wirkung des Malzextraktes doch auch ganz allein auf Konto der vermehrten Menge an Verzuckerungsdiastase gesetzt werden kann. Es ist jedoch durchaus nicht ausgeschlossen und es liegt mir fern es zu bestreiten, dass durch das Zusammenwirken der beiden Kräfte ein wesentlich günstigerer Erfolg in der beiderseitigen Tätigkeit erreicht wird, als wenn eine Kraft für sich allein arbeiten würde. Ob aber die Wirkung der einen Kraft unbedingt an die Gegenwart der andern gebunden ist, dürfte nach meinen Versuchen doch zweifelhaft sein.

Auch dann, wenn man der Zwei-Enzymtheorie zuneigt, wäre eine gegenseitige günstige Beeinflussung nicht ausgeschlossen, insofern nämlich, als das eine die Rolle eines Reizstoffes übernimmt und anregend auf das andere einwirkt, wie solches auch für andere Fermente mit Erfolg nachgewiesen wurde.

Die Ansicht ferner, dass die Amylase in Form eines Proenzyms im Getreidekorn aufgespeichert ist, hat im Hinblick auf ähnliche Verhältnisse bei anderen Enzymen eine gewisse Berechtigung. Bis jetzt ist es aber noch nicht gelungen im vorliegenden Falle einwandfreie Resultate in dieser Beziehung zu erhalten, obwohl das verschwindend geringe Verflüssigungsvermögen im ruhenden Korn, im Vergleich zu dem relativ sehr grossen im Malz (besonders bei Roggen), das Gegenteil vermuten liesse. Alle Versuche der verschiedensten Autoren, ein Enzym aus dem Proenzymstadium in Freiheit zu setzen, lassen selbst unter den günstigsten Bedingungen nur eine verhältnismässig geringe Zunahme erkennen. Wohl hat Reychler gezeigt, dass durch Behandlung von Weizenmehl und Weizenkleber mit verdünnter Essigsäure eine Fermentbildung stattfindet, und Lintner und Eckhardt (Zeitschr. f. d. ges. Brw. 1889) haben die Versuche wiederholt und bestätigt; aber nie wurde die gleiche Wirkung wie mit gekeimtem Korne erhalten.

Die lösende Kraft der Samenkorndiastase soll ferner nach Chrzaczsz durch gewisse äussere Faktoren in ihrer vollen Wirksamkeit gehindert werden. Unter gewissen Umständen wird dieses sicher auch zutreffen. Aber unwillkürlich drängt sich die Frage auf, warum durch denselben Faktor nicht im gleichen Masse die verzuckernde Fähigkeit desselben Enzyms gehemmt wird, da doch die Verflüssigung der Verzuckerung vorangeht, letztere also nicht stattfinden könnte, wenn nicht erstere bereits vorgearbeitet hätte? Die Verzuckerung ist jedoch mit Rohkorndiastase oft sehr beträchtlich, ohne dass eine dementsprechende Verflüssigung gegenübersteht.

Für das Nichtvorhandensein ungünstiger äusserer Einflüsse sprechen auch die Versuche Jalowetz' (Wochschr. f. Br. 1908 S. 557). Er wies nämlich nach, wie bereits eingangs angegeben, dass eine Verflüssigung von 5 und 10prozentigen Stärkekleister mit Samenkorn(Gerste)-Diastase leicht gelingt, wenn man nicht das ganze Getreideschrot zur Extraktion benützt, sondern nur das Mehl der Keimlingsenden. Wären daher hindernde Kräfte im Spiel, so müssten diese auch hier zur Entfaltung gelangen. Allerdings kann man einwenden, dass diese hemmenden Faktoren ja im übrigen Teil des Getreidekornes anwesend sein können.

Um auch diesem Einwurf entgegenzutreten wurde folgender Versuch ausgeführt:

1. Zuerst stellte man einen 5prozentigen Roggenauszug unter den gewöhnlichen Bedingungen her. Dieser zeigte nur ein ganz schwaches Verflüssigungsvermögen.

2. Unter den gleichen Verhältnissen bereitete man einen 5prozentigen Roggenmalzauszug (mit Wasser). Dieser zeigte ein Verflüssigungsvermögen von

$$V = 250.$$

3. Nun wurde wieder ein 5prozentiger Roggenmalzextrakt hergestellt, nur dass statt Wasser, der zuerst gewonnene Roggenmehlauszug zur Digestion benützt wurde. Die verflüssigende Kraft betrug in diesem Falle

$$V = 300.$$

Gegenüber dem vorigen eine geringe Zunahme, die auf die im Roggenauszug vorhandenen anorganischen und organischen Körper zurückgeführt werden kann. Wären aber im ungekeimten Roggen inaktivierende Stoffe zugegen, so hätte auch eine Abschwächung der betreffenden Eigenschaft konstatiert werden müssen.

Alle derartigen Schlussfolgerungen geben ja in diesem oder jenem Falle einen gewissen Aufschluss für eigentümliche Erscheinungen und sind unter bestimmten Verhältnissen auch berechtigt; in diesem Falle aber entbehren sie jeglicher Beweiskraft und sind höchstens nur geeignet noch mehr Verwirrung in das ohnehin schon schwierige Gebiet zu bringen.

Jedenfalls aber geben die Ergebnisse meiner Versuche eine gewisse Berechtigung zu der Annahme, dass wir es in der Tat mit zwei Enzymen, einem verflüssigenden und einem verzuckernden, zu tun haben und sie können vielleicht etwas dazu beitragen, den Streit zu Gunsten der Zwei-Enzymtheorie zu entscheiden.

Um nun diese noch eingehender zu begründen, ist es wohl angebracht hier eine kurze Zusammenstellung der wichtigsten Gesichtspunkte und Beweismomente folgen zu lassen, die im Laufe der Zeit die verschiedensten Forscher zu dieser Ansicht führten.

Für die Gegenwart zweier Enzyme spricht u. a.:

1. Die starke Verzuckerung und schwache Verflüssigung des ruhenden Samenkornes.

2. Die Tatsache, dass die optimale Verzuckerungstemperatur um ca. 10—12° niedriger liegt, als jene der Verflüssigung. (Vgl. Chrzaczsz a. a. O.)

3. Das regelmässige Anwachsen der verzuckernden Kraft bis zu einem Maximum und ebensolche Abnahme derselben im weiteren Verlauf der Keimung; im Gegensatz zum Verflüssigungsvermögen, welches längere Zeit auf der einmal erreichten Höhe bestehen bleibt. (Effront: Wochschr. f. Br. 1905 S. 625.)

4. Die Beobachtung der Fähigkeit der Amylase des Endosperms und des Graskeimes die Stärke zu lösen und zu verzuckern, während die Wurzeldiastase nur zu verflüssigen imstande ist. (Fürstl. v. Teichek: Chem. Ind. Bd. 27 S. 270.)

5. Die Dialysierungsversuche Fränkels und Hamburgs. (Biochem. 1906 Bd. 3 S. 389.)

Einfluss verschiedener Antiseptika auf die diastatischen Enzyme.

Beim Studium der Fermentwirkungen muss immer damit gerechnet werden, besonders wenn die Versuche von längerer Dauer sind, dass unangenehme bakterielle Nebenreaktionen störend eingreifen und dadurch zu Trugschlüssen Anlass geben. Um dieses zu verhindern, ist es sehr häufig geboten, bestimmte Antiseptika hinzuzufügen. Diese Stoffe werden aber selbst wieder in mancher Hinsicht nicht ganz ohne Einfluss auf die Enzyme und ihre Wirksamkeit sein.

So hat F. Weis (Zeitschr. f. d. ges. Brw. 1903 S. 301 u. ff.) die hemmende Wirkung von Thymol auf das proteolytische Enzym nachgewiesen; während Toluol gut verwendbar war.

Lintner und Kröber (Ber. 1895 S. 1055) stellten den störenden Einfluss des Chloroforms auf Hefeglykase fest.

Andererseits findet man auch wieder die Ansicht vertreten, dass ein Zusatz eines Antiseptikums zu einer Enzymlösung die Bakterieninfektion verhindere oder ihre Entwicklung beeinträchtige, während es die Fermente intakt lasse. — Demnach sind widersprechende Meinungen und Beobachtungen beim Studium ein und desselben Vorganges vorhanden. — Gewiss Anlass genug die Sache einmal aufzugreifen und sich Einblick zu verschaffen, soweit dies eben möglich ist.

Man suchte dieses in der Weise zu erreichen, dass man bei verschiedener Konzentration der Enzymlösung die für die Fermente hauptsächlich in Betracht kommenden Antiseptika: Toluol, Chloroform und Äther in verschiedenen Mengen zur Anwendung brachte und die dadurch hervorgerufenen Veränderungen der diastatischen Verzuckerung und zum Teil auch der Verflüssigung bestimmte. Verwendet wurden 5 und 10prozentige Malzauszüge, die dann mit der betreffenden Menge des Antiseptikums versetzt, bei Zimmertemperatur stehen blieben.

Versuch 1.

5prozentiger Malzauszug.

Von Toluol, Chloroform und Äther wurden je 5%; von letzterem ausserdem noch 10% hinzugefügt.

Antiseptika:	Verzuckerungsvermögen F: sofort bestimmt	nach Wochen: 1	2	3	4	6	10	15	22
ohne	218,5	34,5	0	—	—	—	—	—	—
mit 5% Äther	196	140	0	—	—	—	—	—	—
„ 10% „	193,6	171,5	145	118	105	54	0	—	—
„ 5% Chloroform	198,2	197,5	196	193,2	190,1	184	180	172,5	—
„ 5% Toluol.	198,2	198,2	196	194,1	192	186	186	178	151
Verflüssigungsvermögen bei 5 % Toluol	333,3	—	—	—	—	75	—	33	10

Diese Versuchsreihe lässt erkennen, dass Äther als Konservierungsmittel ganz minderwertig ist und für eine längere Versuchsperiode nicht zur Benützung gelangen kann, wenigstens nicht unter den gegebenen Verhältnissen. Möglicherweise sind die günstigen Resultate, die man sonst mit Äther erhielt auf die niedrigere Temperatur (gewöhnlich im Eisschrank) zurückzuführen, bei der derselbe vielleicht eine grössere antiseptische Wirkung zu entfalten vermag, als bei Zimmertemperatur. In diesem Falle zeigte sich bereits nach einer Woche eine beträchtliche Abnahme der Fermentativkraft, die sogar bei 5prozentigem Ätherzusatz nach 2 Wochen ganz aufgehoben ist; während sie bei der 10prozentigen Ätherkonzentration noch einige Zeit, wenn auch sehr geschwächt anhält.

Als brauchbar, die enzymatische Kraft allerdings auch etwas beeinträchtigend, aber dann längere Zeit ziemlich konstant erhaltend, erwiesen sich Toluol und Chloroform, deren desinfizierende Wirkung während der ganzen Beobachtungszeit, als eine gute bezeichnet werden kann. Ohne jeden Zusatz sind Malzauszüge in der Regel nach 2 3 Tagen bereits trüb, riechen unangenehm und

können nicht mehr verwendet werden. Mit Toluol oder Chloroform versetzt sind sie nach 2 Wochen noch völlig klar und zeigen erst nach 4—6 Wochen eine geringe Trübung.

Im Gegensatz zum Verzuckerungsvermögen erlitt die Verflüssigungsenergie in jenem mit Toluol versetzten Auszug eine erhebliche Einbusse, so dass dieselbe bei noch länger dauernden Versuchsperioden ganz zum Verschwinden gebracht werden könnte. Leider wurde dasselbe nicht durchwegs bestimmt, in der, allerdings erst zu spät als falsch erkannten Annahme, dass dessen Verhalten dem der Verzuckerung analog sein würde. Doch deuten die wenigen Stichproben darauf hin, dass die beiden Eigenschaften der Diastase auch in diesem Falle von ein und demselben äusseren Faktor in verschiedener Weise beeinflusst werden.

Versuch 2.

25prozentiger Malzauszug.

Äther wurde auch hier in 5 und 10prozentiger Konzentration angewendet; Toluol und Chloroform dagegen nur soviel, als sich auflöste.

	Verzuckerungsvermögen F: nach Wochen:						
Antiseptika:	1	2	3	4	6	10	15
5 % Äther	897,2	729	567	334	0	—	—
10 % „	890	423	152,1	108	0	—	—
Toluol	905	905	879	834	456	360	0
Chloroform	905	905	795	744	735	729	699

Gegenüber der ersten Versuchsserie zeigt der Äther hier anscheinend ein verschiedenes Verhalten. Dort wirkte die konzentrierte Ätherlösung günstiger, hier die verdünnte.

Auch das Toluol vermochte nicht eine Zerzetzung hintanzuhalten. Scheinbar war die zugefügte Menge doch zu gering; so dass es geboten ist in Zukunft die Versuchsflüssigkeit mit einer dünnen Schicht dieses Antiseptikums zu überdecken.

Die kleinen Verschiedenheiten, welche bei der vergleichenden Betrachtung der beiden Versuchsreihen in die Augen fallen, deuten darauf hin, dass es nicht gleichgültig ist, welche Konzentration der Enzymlösung zum Versuch gewählt wird, da die Wirkung der ein-

zelnen Antiseptika in hohem Masse von dem Verdünnungsgrad derselben abhängt.

Es ist durchaus nicht ausgeschlossen, dass diese Erscheinung mit ein Grund ist, für die vielfach sich widersprechenden Meinungen und Beobachtungen, wie sie zur Beantwortung ein und derselben Frage, in der diesbezüglichen Literatur niedergelegt sind.

Versuche zur Isolierung der Roggenmalzdiastase.

Zum Zwecke eines besseren Vergleichs der Eigenschaften der Roggenmalzdiastase mit jener aus Gerstenmalz, wie sie von der Firma E. Merck in Darmstadt in den Handel kommt, war es erforderlich, die Isolierung der Diastase zu versuchen. Dazu war natürlich ein Malz nötig, das die grösste Menge an Diastase aufgestapelt hatte, was unter den gewöhnlichen Verhältnissen durch eine neuntägige Keimdauer erreicht werden dürfte.

Das so erhaltene Grünmalz wurde zur intensiven Zerkleinerung durch eine Fleischhackmaschine getrieben und hierauf mit dem doppelten Volum Wasser eingeteigt. Nach 4stündigem Stehen bei Zimmertemperatur gab man die breiige Masse, da an ein Filtrieren nicht zu denken war, zunächst durch ein Haarsieb und trieb den Rückstand, um Verluste möglichst zu vermeiden, noch durch eine Handpresse. Die auf diese Weise erhaltene, milchige Flüssigkeit wurde nun über Nacht stehen gelassen, damit sich der grösste Teil der Stärke gut absetzen konnte und um dadurch die Filtration zu beschleunigen. Aber trotzdem ging diese nicht glatt vonstatten, denn infolge der Gegenwart äusserst feiner Bestandteile des Roggenschrotes, welche mit Wasser schleimig aufquellen und die Poren des Filtrierpapiers nach ganz kurzer Zeit verstopfen, zog sich die Filtration fast endlos in die Länge und das mühevoll gewonnene Filtrat war stets durch suspendierte feste Teile des Roggenmehles getrübt. Selbst an der Saugpumpe mit den verschiedensten Sorten Filtrierpapier wurden keine wesentlich günstigeren Erfolge erzielt.

Um nun diese langwierige Operation zu umgehen, wurde die ganze Masse im Scheidetrichter mit Äther gut ausgeschüttelt und nun einige Zeit stehen gelassen. Es bildeten sich allmählich zwei Schichten, eine obere, hellgelb gefärbte Emulsion und eine untere dunkelbraune fast klare Flüssigkeit. Diese letztere wurde sodann mit der dreifachen Menge Alkohol behandelt, wodurch fibrinöse Flocken ausfielen, die abfiltriert, mit Alkohol und Äther gewaschen und im Vakuumexsikkator getrocknet wurden. Dabei resultierte

ein schwachgelblich gefärbtes Pulver, dessen verzuckernde Kraft nach Lintner-Wirth bestimmt = 2000 g Maltose, dessen Verflüssigungsvermögen nach Lintner-Sollied = 1500 betrug. Während ein Präparat der Firma Merck eine verzuckernde Wirkung von 3825 g Maltose und ein Verflüssigungsvermögen von 3000 aufwies.

In der Absicht diese etwas umständliche Arbeitsmethode abzukürzen und zu verbessern, wurde versucht, ähnlich wie es bei der Darstellung der Diastase aus Gerstenmalz schon oft mit Erfolg benützt wurde, mit Ammonsulfat auszusalzen. Dieses Verfahren lässt sich aber nur dann rationell anwenden, wenn ein konzentrierter Roggenmalzauszug zur Verfügung steht. Da aber ein solcher wegen der schlechten Filtration nicht gut herzustellen ist, musste ein verdünnter (1 : 5) durch Ausfrieren erst konzentriert werden, was aber bei diesem Verdünnungsgrad mit ganz erheblichen Verlusten verbunden ist.

Auf diese Art wurde ein schleimiges Produkt erhalten, das, nachdem das anhaftende Ammonsulfat durch Abspritzen auf dem Tonteller entfernt worden war, im Gegensatz zum ersten Präparat, nur ein ganz schwaches Verzuckerungs- und Verflüssigungsvermögen aufwies.

Die Darstellung von Diastase aus Roggenmalz scheint demnach mit ungewöhnlich grossen Schwierigkeiten verknüpft zu sein, weshalb weitere Versuche unterblieben.

Das proteolytische Enzym des Roggenmalzes.

In den Samen, die eine verhältnismässig grössere Menge Eiweiss aufgespeichert enthalten, wurde bald, nachdem der Nachweis der Diastase gelungen war, das Vorkommen eines proteolytischen Enzyms vermutet, das imstande sei, die schon länger bekannten, tiefgreifenden Umsetzungen herbeizuführen, welche sich während der Keimung abspielen. Die vorhandenen Reserveeiweissstoffe unterliegen im weitgehendsten Masse einer Aufteilung in Peptone und Amide, ähnlich jenen Stoffwechselprozessen, welche im tierischen Organismus unter Mitwirkung des Magensaftes und des Pankreassekretes vor sich gehen. Aus den entstandenen Spaltungsprodukten baut sowohl der tierische, als auch der pflanzliche Körper seine eigenen Proteine, seinem Bedürfnis entsprechend, wieder auf.

Deshalb war die Annahme berechtigt, dass auch im Pflanzenreich proteolytische Fermente allgemein verbreitet seien.

Die ersten, welche das Vorkommen eines proteolytischen En-

zyms in keimender Gerste erwähnen, sind Gorup-Besanez und H. Will in ihren Arbeiten aus den Jahren 1874 und 75.

In dem nun folgenden Dezennium wurde die Gegenwart eines solchen bald geleugnet (u. a. Krauch 1878), bald wieder bestätigt u. and. v. Neumeister. Nach diesem letzteren (Zeitschr. f. Biolog. 30 S. 447) enthalten nur Gerste, Mohn und Rüben, Mais- und Weizenkeimlinge eiweisslösende Fermente. Nach der angewandten Methode gelang es ihm nämlich nicht, bei anderen Keimlingen und jungen Pflanzen (Lupinen, Wicken, Erbsen, Roggen und Hafer) solche Enzyme nachzuweisen, weshalb er die Eiweissspaltung, die er bei den obigen Samen beobachtete auf eine Tätigkeit des lebenden Protoplasmas zurückführte.

Ebenso konnte Laszcinsky kein eiweissabbauendes Enzym konstatieren.

Die Anwesenheit eines proteolytischen Fermentes im Gerstenmalz wurde von Windisch und Schellhorn (Wochschr. f. Br. 1900), ferner von Lintner (Wochschr. f. Br. 1902 S. 701) unzweifelhaft nachgewiesen. Sie benützten dazu eine Abänderung der bekannten Fermi'schen Methode, indem sie Malzauszug auf Gelatine bei ca. 40° C längere Zeit einwirken liessen und den Punkt feststellten, bei dem die Gelatine ihr Erstarrungsvermögen verloren hatte.

Fernbach und Hubert (Com. rend. 81 S. 349) wiesen auf ähnliche Weise das Enzym nach. Ausserdem studierten sie noch den Einfluss von Phosphaten und anderer anorganischen Salze und Säuren. Die Arbeiten von Butkewitsch (Ber. d. bot. Ges.) bestätigen ebenfalls das Vorkommen eines eiweisslösenden Enzyms im Pflanzenreich.

Es war daher von Anfang an die Existenz eines proteolytischen Fermentes im Roggen ausser Frage gestellt, obwohl wie oben angedeutet, es an gegenteiligen Ansichten in der Literatur nicht fehlt; vielmehr sollten weitere Beweise für das Vorkommen eines solchen Enzyms gebracht und die Beeinflussung dessen Wirkung von verschiedenen Faktoren näher verfolgt werden.

Die ersten orientierenden Versuche wurden nach einer Modifikation der Fermi'schen Methode ausgeführt, wie sie auch schon früher von Lintner zur Anwendung kam und zwar in der Weise, dass Gelatine wenige Grade über ihren Erstarrungspunkt mit der zu prüfenden Substanz versetzt, gut durchgeschüttelt und dann im Thermostaten bei 40° C längere Zeit gehalten wurde. Nach gewissen Zeitabschnitten wurden dann die Proben durch rasches Abkühlen auf eingetretene Verflüssigung geprüft.

Versuch 1.

Zur Anwendung kam 8prozentige Gelatine. Je 20 ccm davon wurden in weite Reagiergläser gegeben mit 10 ccm einer 2prozentigen Enzymlösung vermischt und dann in den Brutschrank von 40° C gestellt.

Die Gelatine hatte erst nach 35 Stunden ihr Erstarrungsvermögen verloren.

Es liegt auf der Hand, dass bei einer so langen Versuchsdauer noch dazu bei einer Temperatur, die für die Entwicklung mancher Bakterien äusserst günstig ist, die Gefahr besteht leicht zu Trugschlüssen verleitet zu werden. Um diesem vorzubeugen wäre bei dieser Einwirkungszeit ebenfalls der Zusatz eines Antiseptikums unbedingt geboten. Nun hat aber Fr. Weis (vgl. Wochschr. f. Br. 1900 S. 748) durch Versuche dargelegt, dass das eiweissspaltende Enzym, im Gegensatz zu manchen andern Fermenten gegen Antiseptika sehr empfindlich ist, weshalb die Anwendung eines solchen Stoffes von vornherein ausser Betracht blieb.

Es galt nun eine kürzere Versuchsdauer zu wählen, innerhalb der, eine Beeinträchtigung durch Bakterien ausgeschlossen war. Dieses konnte in doppelter Weise erreicht werden. Einmal dadurch, dass man konzentriertere Malzauszüge anwendete und andererseits, dass man verdünnte Gelatinelösungen benützte.

Was nun den Verdünnungsgrad der Gelatinelösung anlangt, so ist diesem eine Grenze gesetzt, da man ja bei zu starker Verdünnung befürchten muss, dass das Erstarrungsvermögen dadurch beeinträchtigt wird. Durch eine Reihe von Versuchen war deshalb der Punkt zu fixieren, bis zu dem die Verdünnung ausgedehnt werden darf. Dabei hat sich eine 4prozentige Gelatinelösung als zweckmässig gezeigt. Man kann hier bis 5 ccm Wasser und darüber hinzufügen, ohne eine Befürchtung im obigen Sinne hegen zu müssen.

4 ccm einer Enzymlösung, die sonst 40^{h} bis zur vollkommenen Verflüssigung benötigte, vermochte dieses in 9—10 Stunden zu bewirken.

Grosse Schwierigkeiten bieten sich aber bei der Herstellung eines hochprozentigen Roggenmalzauszuges, infolge der äusserst schwierigen Filtration. Bei enzymreicheren Malzen hat es ja weiter keine Bedenken, da man hier mit verdünnteren Extrakten auskommen kann, wohl aber, wenn es nötig ist, wie im vorliegenden Falle, die Entwicklung des Enzyms, während der ganzen Keimperiode zu verfolgen, was auch ein Arbeiten mit kurzgekeimten und daher fermentärmeren Malzen erfordert. Hier sind Auszüge von einer Konzentration 1:3 oder 1:4 nötig, wenn die Verflüssigung in der

oben angeführten Zeit erreicht werden soll. Da aber bei dieser Arbeitsweise für eine Bestimmung nicht mehr, als 4 ccm Auszug gebraucht werden und ausserdem die Filtration anfänglich immer etwas rascher vor sich geht, so kann man mit wenig Material auskommen, um den gewünschten Zweck zu erreichen. So z. B. erhält man aus 10 g Malz, das mit 40 ccm Wasser digeriert wurde, ca. 10 ccm Auszug, die gerade hinreichen 4 Bestimmungen anzusetzen, nämlich 1 Röhrchen mit 4 ccm, eines mit 3 ccm, eines mit 2 und eines mit 1 ccm. Selbstverständlich wird der fehlende Auszug in den letzteren Röhrchen durch die entsprechende Menge Wasser ersetzt, um überall gleiches Flüssigkeitsquantum zu erhalten.

Nachdem eine Reihe von Vorversuchen gezeigt hatten, dass ein wässeriger Roggenmalzauszug wirklich proteolytische Eigenschaften besitzt, schritt man zur Prüfung der Abhängigkeit der Enzymwirkung von der Einwirkungstemperatur. Zu diesem Zweck wurden die Versuche bei den Temperaturen 30°, 40°, 50° und 60° C mit ein und demselben Roggenmalzauszug ausgeführt.

1. Einwirkungstemperatur 30° C.

			nach 1 h	2 h
Röhrchen I	10 ccm Gelatinelösung	+ 1 ccm Auszug + 3 ccm Wasser	fest	fest
„ II	10 „ „	+ 2 „ „ + 2 „ „	„	„
„ III	10 „ „	+ 3 „ „ + 1 „ „	„	dickfl.
„ IV	10 „ „	+ 4 „ „ + 0 „ „	flüssig	flüssig

2. Einwirkungstemperatur 40° C.

Je 10 ccm Gelatinelösung.

			nach 1 h	2 h
Röhrchen I	+ 1 ccm Auszug	+ 3 ccm Wasser	fest	fest
„ II	+ 2 „ „	+ 2 „ „	„	flüssig
„ III	+ 3 „ „	+ 1 „ „	dickfl.	„
„ IV	+ 4 „ „	+ 0 „ „	flüssig	„

3. Einwirkungstemperatur 50° C.

Jedes Röhrchen mit je 10 ccm Gelatinelösung versetzt!

			nach 1 h	2 h
Röhrchen I	1 ccm Auszug	+ 3 ccm Wasser	fest	fest
„ II	2 „ „	+ 2 „ „	fest	flüssig
„ III	3 „ „	+ 1 „ „	flüssig	„
„ IV	4 „ „	+ 0 „ „	„	„

4. Einwirkungstemperatur 60° C.

			nach 1 h	2 h
Röhrchen I	1 ccm Auszug	+ 3 ccm Wasser	fest	fest
„ II	2 „ „	+ 2 „ „	„	„
„ III	3 „ „	+ 1 „ „	„	flüssig
„ IV	4 „ „	+ 0 „ „	flüssig	„

5. Einwirkungstemperatur 70° C.

				nach 2 Stunden
Röhrchen	I	1 ccm Auszug	+ 3 ccm Wasser	fest
„	II	2 „ „	+ 2 „ „	fest
„	III	3 „ „	+ 1 „ „	fest
„	IV	4 „ „	+ 0 „ „	fest.

Anscheinend war die Wirkung bei 50° C günstiger, denn der Inhalt der Röhrchen erstarrte etwas langsamer, als jener der entsprechenden Versuche bei 40° C.

Auch Fr. Weis (l. c.) fand, dass das Optimum nahe bei 50° C liegt.

Charakteristisch ist auch hier wieder, wie bei allen fermentativen Prozessen, das langsame Ansteigen der enzymatischen Kraft bis zum Optimum, bei ca. 50° C, und dann das schroffe Abfallen bis zur vollständigen Vernichtung bei 70°.

Wie bereits erwähnt, ist es bei allen Fermentuntersuchungen von grosser Bedeutung zu bestimmen, ob der Vorgang von irgend einer fremden Substanz beeinflusst wird und besonders wie und in welchem Masse er von der Reaktion des Substrates abhängig ist.

Je nachdem die Wirkung in schwachalkalischer oder schwachsaurer Lösung vor sich geht, unterscheidet man, ausser durch ihre Spaltungsprodukte, die wichtigsten tierischen proteolytischen Enzyme, das Trypsin vom Pepsin.

Da nun das eiweissspaltende Ferment der gekeimten Gerste in sodaalkalischer Lösung noch stärker arbeitet, als in neutraler, schloss Windisch auf die triptische Natur desselben. Zu beachten ist aber, dass die günstige Wirkung des Alkalis nur bei der Proteolyse von tierischem Eiweiss (Gelatine), nicht dagegen von pflanzlichen Protein zu finden ist; — eine Erscheinung, die manche in der Literatur vorhandenen Widersprüche aufklären dürfte.

Meine Versuche lassen gleichfalls erkennen, dass die Proteolyse in schwachalkalischem Medium kräftiger vonstatten geht, dass das Enzym sich gegenüber weiterem Zusatz von Alkali aber sehr empfindlich erweist.

Versuch 2.

1. Jedes Röhrchen wurde mit 10 ccm Gelatinelösung versetzt.

				nach 1 h	2 h
Röhrchen	I	+ 1 ccm Auszug	. . . . .	fest	fest
„	II	+ 1 „ „	+ 0,02 g Soda	dickfl.	flüssig
„	III	+ 2 „ „	+ 0 „ „	„	„
„	IV	+ 2 „ „	+ 0,02 „ „	flüssig	„

2. Angewandt wurde hier eine 2prozentige Sodalösung.

									nach 1 h	2 h
Röhrchen	I	1 ccm	Ausz.	+ 1 ccm	Sodalösung	+ 3 ccm	Wasser		gallertig	flüssig
„	II	1 „	„	+ 2 „	„	+ 2 „	„		„	„
„	III	1 „	„	+ 3 „	„	+ 1 „	„		fest	gallertig
„	IV	1 „	„	+ 4 „	„	+ 0 „	„		fest	fest

Über die Wirkungsweise des Alkalis bei der tryptischen Verdauung hat man noch keine sichere Vorstellung.

Fernbach und Hubert behaupten zwar, dass der Alkalizusatz solange günstig wirkt, bis die Neutralisation auf Methylorange noch nicht erreicht ist, dass also auf die primären Phosphate die günstige Beeinflussung zurückzuführen wäre. Aber man muss in Erwägung ziehen, dass bei der Spaltung der Eiweisskörper freie Aminosäuren entstehen, welche ihrerseits die Bindung der freien Hydroxylgruppen veranlassen würden, wodurch eine Änderung in der Reaktionsgeschwindigkeit notwendig bedingt wäre. Doch konnte der Nachweis einer Beschleunigung oder Verzögerung im zeitlichen Verlauf einer Proteolyse bis jetzt nicht mit Erfolg geführt werden. (Vgl. Euler; l. c.)

Was die Einwirkung sehr verdünnter Säuren anlangt, so glaube ich ebenfalls eine Förderung der fermentativen Tätigkeit nachgewiesen zu haben, wie folgende Versuchsreihe zeigt.

Versuch 3.

Je 10 ccm Gelatinelösung.

										nach 8 Stunden
Röhrchen	I	1 ccm	Auszug	+ 1 ccm	$^1/_{10}$ n HCl	+ 2 ccm	Wasser			fest
„	II	1 „	„	+ 2 „	„ „	„ „	+ 1 „	„		flüssig
„	III	1 „	„	+ 0 „	„ „	„ „	+ 3 „	„		fest
„	IV	0 „	„	+ 2 „	„ „	„ „	+ 2 „	„		„

Aber trotz der günstigen Beeinflussung durch geringe Säuremengen, dürfte weiterer Zusatz bereits störend wirken, wie folgende Tabelle kundgibt.

										nach 4 Stunden
Röhrchen	I	1 ccm	Auszug	+ 0 ccm	$\frac{n}{2}$	HCl	+ 1 ccm	Wasser		flüssig
„	II	1 „	„	+ 0,1 „	„	„	+ 0,9 „	„		„
„	III	1 „	„	+ 0,6 „	„	„	+ 0,4 „	„		dickflüssig
„	IV	1 „	„	+ 1 „	„	„	+ 0 „	„		„

Entwicklung des proteolytischen Enzyms und der Diastase während der Keimung.

Windisch und Schellhorn erwähnen, dass bereits in roher Gerste ein proteolytisches Ferment enthalten sei, das zuweilen in schlecht geernteten oder eiweissreicheren Gerstensorten in beträchtlicher Menge auftreten kann.

Um den Roggen ebenfalls auf diese Verhältnisse hin zu untersuchen, musste ein 50prozentiger Auszug bereitet werden. Eine Verflüssigung konnte unter den obigen Bedingungen und unter der angegebenen Zeit von 8—10 Stunden nicht erzielt werden; aber die Erstarrung der Gelatine erfolgte hier wesentlich langsamer, als jene eines gleichzeitig angesetzten blinden Versuchs.

Das gleiche Ergebnis lieferte eine Probe mit einem Roggen, der einen Tag geweicht wurde. Während dieser Zeit hat somit keine sichtbare Zunahme des proteolytischen Effekts stattgefunden. Diese trat aber sofort ein bei Beginn der Keimung, um dann im weiteren Verlauf derselben, soweit diese wenigstens verfolgt wurde, im steten Anwachsen zu bleiben.

In der folgenden Tabelle ist als Massstab zugrunde gelegt, ein Roggenmalzauszug 1 : 4, von dem 4 ccm in 4 Stunden die Verflüssigung von 10 ccm einer 4prozentigen Gelatinelösung bewirken. Die proteolytische Kraft (Pk) wird dann gleich 100 gesetzt.

Keimdauer in Tagen	Auszug-mengen	Auszug-konzentr.	Einwirkungs-dauer	Pk
1	4 ccm	1 : 4	9 h	44,4
3	2 „	1 : 4	7 h	114,2
5	2 „	1 : 4	6 h	133,3
7	4 „	1 : 10	6 h	166,6
9	3 „	1 : 8	6 h	177,7
11	2 „	1 : 8	8 h	200
13	2 „	1 : 8	5 h	320
15	1 „	1 : 5	5 h	400

Hand in Hand mit diesen Versuchen ging eine Bestimmung der stärkeverflüssigenden und stärkeverzuckernden Kraft der Roggenmalzdiastase. Der hier zur Anwendung gekommene Roggen war von anderer Provenienz, als jener der im ersten Teil dieser Arbeit zur Benützung gelangte:

Keimdauer in Tagen	Verflüssigungs-vermögen	Verzuckerungs-vermögen
0	0	98,9
1	33,3	112,5
3	125	121,6
5	166,6	134,3
7	250	143,4
9	425	303,9
11	500	324,0
13	500	286,5
15	495,6	180

Die Zunahme der beiden diastatischen Eigenschaften geht ziemlich rasch vor sich; dieselbe erfolgt beim Verzuckerungsvermögen bis zu einem Maximum das in diesem Falle bei 11tägiger Keimdauer liegt; von da ab fällt es wieder. Ähnliches Verhalten zeigt das Verflüssigungsvermögen; doch scheint hier die einmal erreichte Höhe längere Zeit bestehen zu bleiben, — eine Erscheinung die bei Gerste zuerst Effront konstatierte und die gleichfalls die Gegenwart zweier Enzyme vermuten lässt.

Wie Schidrowitz (Wochschr. f. Br. 1904 S. 195) angibt, konnte er durch den Schwelkprozess eine beträchtliche Abnahme in der proteolytischen Kraft, nämlich um die Hälfte, beobachten. Hierüber angestellte Versuche, welche selbstverständlich den Wassergehalt vor und nach dem Schwelken berücksichtigen, ergaben dagegen nur eine verhältnismässig geringe Abschwächung in der eiweissspaltenden Kraft.

1. Vor dem Schwelken:

Wassergehalt 57,96%.

2 ccm Auszug 1:4 verflüssigen in 6 Stunden. Daraus berechnet sich die proteolytische Kraft

Pk = 221,4.

2. Nach dem Schwelken:

Wassergehalt 6,75%.

2 ccm Auszug 1:4 verflüssigen in 4 Stunden.

Pk demnach = 214,3.

Zusammenfassung der Resultate.

1. Die diastatischen Roggenenzyme sind in Wasser sehr leicht löslich; die bei höherer Extraktionstemperatur (50° C) beobachtete kräftigere Wirkung der Enzyme ist auf die grössere Löslichkeit der Enzyme und nicht auf Vermehrung der Säure zurückzuführen.

2. Die Regeneration des durch Erhitzen verloren gegangenen Fermentativvermögens ist nur in geringem Grade möglich.

3. Das Verzuckerungsvermögen des Gerstenmalzes übertrifft jenes des Roggenmalzes; die verflüssigende Kraft dagegen zeigt das umgekehrte Verhalten.

4. Das Verflüssigungsvermögen wird gleich dem verzuckernden von anorganischen und organischen Stoffen teils günstig, teils ungünstig beeinflusst.

Die inaktivierende Wirkung der Alkalien kann je nach der Konzentration und der Einwirkungsdauer ganz oder teilweise wieder aufgehoben werden und ist ferner, in bezug auf das Verzuckerungsvermögen, der zugefügten Alkalimenge und der Einwirkungsdauer annähernd proportional.

5. Die hemmende Wirkung der Säuren verläuft wohl anfänglich ebenfalls der zugesetzten Säuremenge proportional, doch kann im weiteren Verlauf der Einwirkung und hinsichtlich der Einwirkungsdauer von einer Gesetzmässigkeit nicht mehr die Rede sein.

Während nun bei längerer Einwirkungsdauer ein und derselben Säuremenge das Verzuckerungsvermögen annähernd konstant bleibt, nimmt das verflüssigende beständig ab, und kommt schliesslich ganz zum Verschwinden. Dieses Verhalten lässt auf die Existenz zweier Enzyme, ein verflüssigendes und ein verzuckerndes, schliessen.

6. Die Antiseptika Toluol und Chloroform bekunden wohl einen abschwächenden Einfluss; erweisen sich aber doch als brauchbare Konservierungsmittel; Äther steht ihnen unter den gleichen Bedingungen bei weitem nach.

7. Das proteolytische Enzym des Roggenmalzes zeigt ähnliche Eigenschaften wie jenes der Gerste und zwar:

a) Die Optimumstemperatur liegt bei ca. 50° C.

b) Die Wirkung ist in schwachsodaalkalischer Lösung am kräftigsten.

c) Im ungekeimten Roggen kann keine proteolytische Wirkung konstatiert werden; sie äussert sich aber sofort beim Beginn der Keimung, um im weiteren Verlauf derselben beständig zu wachsen.

Beim Vergleich der proteolytischen Kraft von Grün- und Schwelkmalz zeigt letzteres nur eine unbedeutende Abschwächung.

Nachtrag.

Vorliegende Arbeit war bereits abgeschlossen, als von Chrzaszcz in der Wochenschrift für Brauerei 42, 1911, eine vorläufige Mitteilung erschien, wonach es ihm gelungen ist, durch fraktionierte Fällung mit Ammonsulfat eine Trennung der beiden Diastasen herbeizuführen. Er kommt zu dem Schluss:

> „Dass die Diastase grundsätzlich aus zwei verschiedenen Körpern sich zusammensetzt; dem einen, welcher die Stärke löst und einem, der sie verzuckert."

Das Hauptergebnis obiger Arbeit wird dadurch bereits bestätigt.